



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109071961 B

(45) 授权公告日 2021.04.27

(21) 申请号 201780028255.0

专利权人 美国索尼公司

(22) 申请日 2017.05.11

(72) 发明人 T·马特雷

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 109071961 A(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所  
有限公司 11038

(43) 申请公布日 2018.12.21

代理人 王贵杰

(30) 优先权数据  
62/334,957 2016.05.11 US(51) Int.Cl.  
C09B 69/10 (2006.01)(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2018.11.07(56) 对比文件  
EP 2366785 A1, 2011.09.21  
EP 2366785 A1, 2011.09.21  
CN 105377994 A, 2016.03.02  
US 2013059343 A1, 2013.03.07(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2017/032206 2017.05.11(87) PCT国际申请的公布数据  
W02017/197144 EN 2017.11.16

审查员 王中良

(73) 专利权人 索尼公司  
地址 日本东京

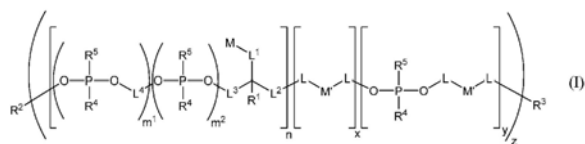
权利要求书5页 说明书35页

## (54) 发明名称

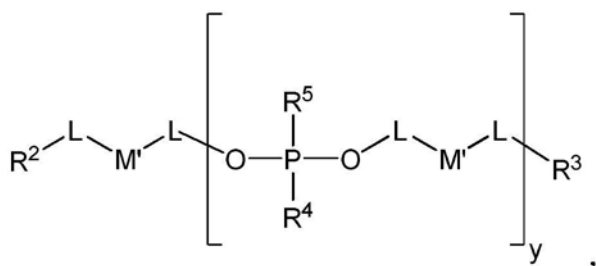
超亮二聚或聚合染料

## (57) 摘要

公开了可用作荧光染料或有色染料的化合物。所述化合物具有以下结构(I)或其立体异构体、互变异构体和盐,其中 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $L$ 、 $L^1$ 、 $L^2$ 、 $L^3$ 、 $L^4$ 、 $M$ 、 $M'$ 、 $m^1$ 、 $m^2$ 、 $n$ 、 $x$ 、 $y$ 和 $z$ 如本文定义。还提供与制备和使用这类化合物相关的方法。



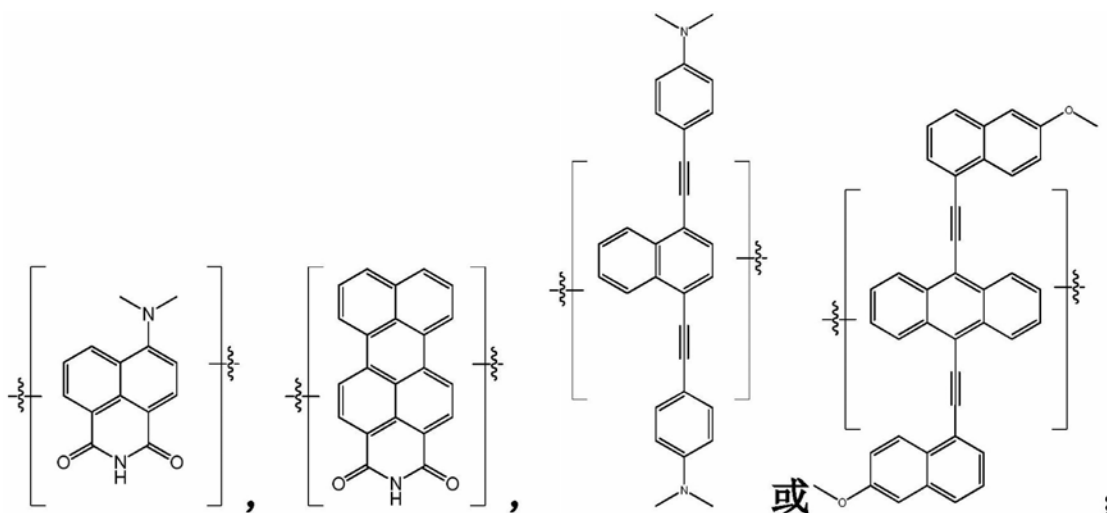
1. 具有以下结构 (IA) 的化合物:



(IA)

或其立体异构体、盐或互变异构体, 其中:

M' 在每次出现时独立地为二价部分: 苌, 6-FAM, 二甲基氨基苌, 喹吖啶酮, 氟苯基-二甲基-BODIPY, his-氟苯基-BODIPY, 吖啶, 三蔡嵌二苯, 联六苯, 卟啉, 苯并苌, (氟苯基-二甲基-二氟硼杂-二氮杂-引达省) 苯基, (双-氟苯基-二氟硼杂-二氮杂-引达省) 苯基, 四联苯, 联苯并噻唑, 三联苯并噻唑, 联蔡, 联蒽, 方酸类化合物, squarylium, 9,10-乙炔基蒽, 三联蔡部分, 对三联苯, 花, 偶氮苯, 吩嗪, 菲咯啉, 吖啶, 噻吨, **蒽**, 红荧烯, 蔻, 花青, 花酰亚胺, 花一酰亚胺, 花酰胺, 香豆素染料, 试卤灵染料, 二吡咯亚甲基硼二氟化物染料, 钆联吡啶染料, 能量转移染料, 噻唑橙染料, 聚甲炔, N-芳基-1,8-蔡二甲酰亚胺染料, 或者 M' 具有以下结构之一:



L 在每次出现时独立地为 C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 亚烷基连接基;

R<sup>2</sup> 和 R<sup>3</sup> 各自独立地为 H、OH、SH、烷基、烷氧基、烷基醚、杂烷基、-OP(=R<sub>a</sub>)(R<sub>b</sub>)R<sub>c</sub>、Q 或 L';

R<sup>4</sup> 在每次出现时独立地为 OH、SH、O<sup>-</sup>、S<sup>-</sup>、OR<sub>d</sub> 或 SR<sub>d</sub>;

R<sup>5</sup> 在每次出现时独立地为氧代、硫代或不存在;

R<sub>a</sub> 是 O 或 S;

R<sub>b</sub> 是 OH、SH、O<sup>-</sup>、S<sup>-</sup>、OR<sub>d</sub> 或 SR<sub>d</sub>;

R<sub>c</sub> 是 OH、SH、O<sup>-</sup>、S<sup>-</sup>、OR<sub>d</sub>、OL', SR<sub>d</sub>、烷基、烷氧基、杂烷基、杂烷氧基、烷基醚、烷氧基烷基醚、磷酸酯、硫代磷酸酯、磷酸烷基、硫代磷酸烷基、磷酸烷基醚或硫代磷酸烷基醚;

R<sub>d</sub> 是抗衡离子;

Q 在每次出现时独立地为包含反应性基团或其被保护的类似物的部分, 其能够与分析

物分子、靶向部分、固体支持物或互补反应性基团Q'形成共价键；

L'在每次出现时独立地为包含与Q的共价键的连接基,包含与靶向部分的共价键的连接基,包含与分析物分子的共价键的连接基,包含与固体支持物的共价键的连接基,包含与固体支持物残基的共价键的连接基,包含与核苷的共价键的连接基或包含与结构(IA)的其它化合物的共价键的连接基;且

y是1-10的整数。

2. 权利要求1的化合物,其中L在每次出现时独立地为C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>亚烷基连接基。

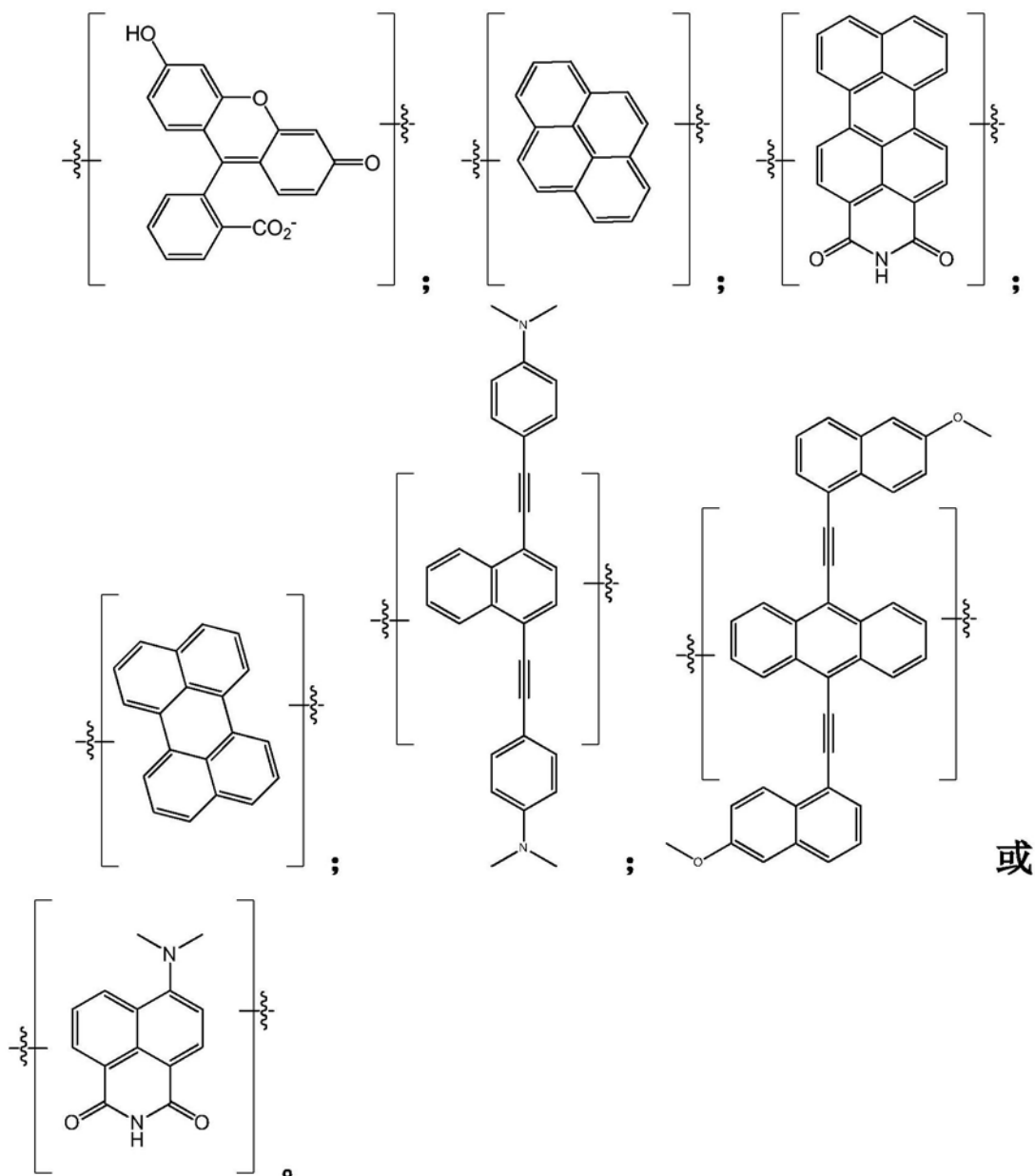
3. 权利要求1的化合物,其中M'在每次出现时独立地为二价部分:二甲基氨基芪,喹吡啶酮,氟苯基-二甲基-BODIPY, his-氟苯基-BODIPY, 吡啶, 三苯胺二苯, 联六苯, 卟啉, 苯并芪, (氟苯基-二甲基-二氟硼杂-二氮杂-引达省) 苯基, (双-氟苯基-二氟硼杂-二氮杂-引达省) 苯基, 四联苯, 联苯并噻唑, 三联苯并噻唑, 联萘, 联蒽, 方酸类化合物, squarylium, 9, 10-乙炔基蒽或三联萘部分。

4. 权利要求1的化合物,其中M'在每次出现时独立地为二价部分:对三联苯,花,偶氮苯,吩嗪,菲咯啉,吡啶,噻吨, **蒽**, 红荧烯, 蒽, 花青, 花酰亚胺, 或花酰胺。

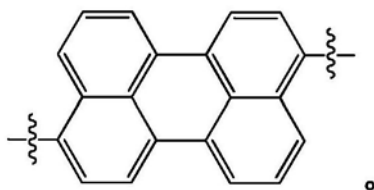
5. 权利要求1的化合物,其中M'在每次出现时独立地为二价部分:香豆素染料,试卤灵染料,二吡咯亚甲基硼二氟化物染料,钌联吡啶染料,能量转移染料,噻唑橙染料,聚甲炔或N-芳基-1,8-萘二甲酰亚胺染料。

6. 权利要求1的化合物,其中M'在每次出现时独立地为二价部分:芪,花,花一酰亚胺或6-FAM。

7. 权利要求1的化合物,其中M'在每次出现时独立地具有以下结构之一:



8. 权利要求1的化合物,其中M'在每次出现时具有以下结构:



9. 权利要求1的化合物, 其中 $R^4$ 在每次出现时独立地为OH、 $O^-$ 或 $OR_d$ 。

10. 权利要求1的化合物,其中R<sup>5</sup>在每次出现时为氧代。

11. 权利要求1的化合物, 其中 $R^2$ 和 $R^3$ 各自独立地为OH或 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ 。

12. 权利要求1的化合物, 其中 $R^2$ 或 $R^3$ 之一为OH或 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ , 且 $R^2$ 或 $R^3$ 的另一个为Q或为包含与Q的共价键的连接基。

13. 权利要求1的化合物,其中Q包含亲核反应性基团、亲电反应性基团或环加成反应性基团。

14. 权利要求13的化合物,其中Q包含巯基,二硫化物,活化酯,异硫氰酸酯,叠氮化物,炔烃,烯烃,二烯,亲双烯体,酰卤,磺酰卤,膦, $\alpha$ -卤代酰胺,生物素,氨基或马来酰亚胺官能团。

15. 权利要求14的化合物,其中活化酯为N-琥珀酰亚胺酯、亚氨酸酯或多氟苯基酯。

16. 权利要求14的化合物,其中叠氮化物是烷基叠氮化物或酰基叠氮化物。

17. 权利要求1的化合物,其中Q是选自表1的部分。

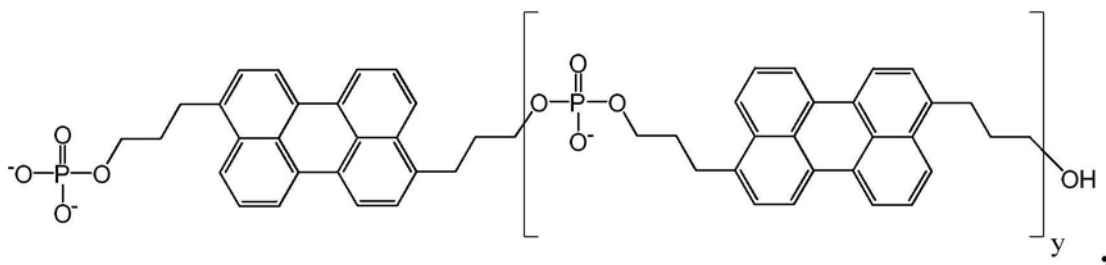
18. 权利要求1的化合物,其中 $R^2$ 或 $R^3$ 之一为OH或 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ ,且 $R^2$ 或 $R^3$ 的另一个为包含与分析物分子的共价键的连接基或为包含与固体支持物的共价键的连接基。

19. 权利要求18的化合物,其中所述分析物分子是核酸、氨基酸或其聚合物。

20. 权利要求18的化合物,其中所述分析物分子是酶、受体、受体配体、抗体、糖蛋白、适配体或朊病毒。

21. 权利要求18的化合物,其中所述固体支持物是聚合物珠粒或非聚合物珠粒。

22. 化合物,具有以下结构:



其中y是1-10的整数。

23. 染色样品的方法,包括向所述样品中加入权利要求1-22任一项的化合物,其用量足以在所述样品在适当的波长被照射时产生光学响应。

24. 权利要求23的方法,其中所述光学响应是荧光响应。

25. 权利要求23-24任一项的方法,其中所述样品包含细胞。

26. 权利要求25的方法,还包括通过流式细胞术观察所述细胞。

27. 权利要求24的方法,还包括将所述荧光响应与具有可检测出不同的光学性质的第二荧光团的荧光响应区分开。

28. 用于视觉检测分析物分子的方法,所述方法包含:

(a) 提供权利要求1-21任一项的化合物,其中 $R^2$ 或 $R^3$ 是包含与分析物分子的共价键的连接基;和

(b) 通过所述化合物的可视性质检测所述化合物。

29. 用于视觉检测分析物分子的方法,所述方法包含:

(a) 混合权利要求1-21任一项的化合物与分析物分子,其中 $R^2$ 或 $R^3$ 为Q或为包含与Q的共价键的连接基;

(b) 形成所述化合物与所述分析物分子的缀合物;和

(c) 通过所述缀合物的可视性质检测所述缀合物。

30. 组合物,包含权利要求1-22任一项的化合物和一种或多种分析物分子。

31. 权利要求30的组合物在用于检测一种或多种分析物分子的分析方法中的用途。

32. 确定样品中死细胞存在的方法,所述方法包含使所述样品与权利要求1-22任一项

的化合物接触,从而使所述化合物与死细胞结合或缔合,并观察来自与所述死细胞结合或缔合的化合物的荧光信号。

33. 权利要求32的方法,还包括应用流式细胞术观察与死细胞结合或缔合的化合物。

34. 权利要求32的方法,其中 $R^2$ 和 $R^3$ 各自独立地为OH或-OP(=R<sub>a</sub>)(R<sub>b</sub>)R<sub>c</sub>。

35. 组合物,包含权利要求1-22任一项的化合物和环糊精。

36. 权利要求35的组合物,其中所述环糊精是 $\alpha$ -环糊精、 $\beta$ -环糊精或 $\gamma$ -环糊精。

37. 权利要求35的组合物,其中该组合物包含水。

## 超亮二聚或聚合染料

[0001] 背景

[0002] 领域

[0003] 本发明一般涉及二聚和聚合荧光染料或有色染料及其制备方法和在多种分析方法中的用途。

[0004] 相关申请的描述

[0005] 已知荧光染料和/或有色染料特别适合其中需要高度灵敏的检测试剂的应用。能够优先地标记样品中特定组分或成分的染料能使研究者确定特定组分或成分的存在、数量和/或位置。此外,可以就多样环境中其空间分布和时间分布监测特定系统。

[0006] 荧光法和比色法在化学和生物学中应用特别广泛。这些方法产生关于生物分子存在、结构、距离、取向、复合状态和/或位置的有用信息。此外,时间解析法日益地用于动态学和动力学的测量。因此,已经开发了用于荧光标记或颜色标记生物分子(如核酸和蛋白质)的许多策略。由于生物分子的分析典型地发生在水性环境中,所以已经集中于研发和使用水溶性染料。

[0007] 高荧光或有色染料是理想的,因为这些染料的使用增加了信噪比并提供了其它相关的益处。因此,已经尝试增加来自已知荧光和/或有色部分的信号。例如,已经制备了包含两个或更多个荧光和/或有色部分的二聚和聚合化合物,预期这些化合物会产生更亮的染料。然而,作为分子内荧光猝灭的结果,已知的二聚和聚合染料未达到所期望的亮度增加。

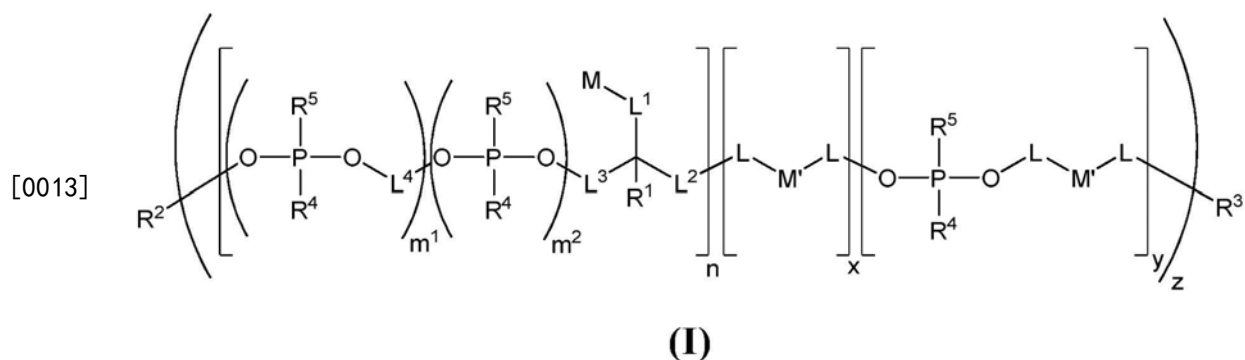
[0008] 因此本领域需要具有增加的摩尔亮度的水溶性染料。理想地,这类染料和生物标记物应当强烈显色或发荧光并且应当以多种颜色和荧光波长可获得。本发明满足这种需要并且进一步提供相关优点。

[0009] 简述

[0010] 简言之,本发明的实施方案一般涉及可用作能够视觉检测分析物分子例如生物分子的水溶性、荧光和/或有色染料和/或探针的化合物,以及制备它们的试剂。还描述了用于视觉检测生物分子的方法。

[0011] 本发明实施方案的水溶性、荧光或有色染料是强烈着色的和/或荧光的,且可以通过视觉检查或其它方式容易地观察到。在一些实施方案中,化合物可以在没有预先照射或化学或酶促活化的情况下被观察到。如本文所述,通过适当选择染料,可以获得各种颜色的视觉上可检测的分析物分子。

[0012] 在一个实施方案中,提供了具有以下结构(I)的化合物:



[0014] 或其立体异构体、互变异构体或盐,其中 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $L$ 、 $L^1$ 、 $L^2$ 、 $L^3$ 、 $L^4$ 、 $M$ 、 $M'$ 、 $m^1$ 、 $m^2$ 、 $n$ 、 $x$ 、 $y$ 和 $z$ 如本文定义。结构(I)的化合物在许多应用中具有实用性,包括在各种分析方法中用作荧光和/或有色染料。

[0015] 在另一个实施方案中,提供了一种染色样品的方法,所述方法包含向所述样品中加入足以在所述样品在适当的波长被照射时产生光学响应的量的结构(I)的化合物。

[0016] 在另外的实施方案中,本公开提供了用于视觉检测分析物分子的方法,所述方法包含:

[0017] (a) 提供(I)的化合物;和

[0018] (b) 通过所述化合物的可视性质检测所述化合物。

[0019] 其它公开的方法包含用于视觉检测生物分子的方法,所述方法包含:

[0020] (a) 混合结构(I)的化合物与一种或多种生物分子;和

[0021] (b) 通过所述化合物的可视性质检测所述化合物。

[0022] 另外的实施方案提供了用于视觉检测分析物的方法,所述方法包含:

[0023] (a) 提供如本文公开的化合物,其中 $R^2$ 或 $R^3$ 包含连接基,所述连接基包含与对分析物具有特异性的靶向部分的共价键;

[0024] (b) 混合所述化合物和所述分析物,由此使所述靶向部分与所述分析物缔合;和

[0025] (c) 通过所述化合物的可视性质检测所述化合物。

[0026] 其它实施方案涉及包含结构(I)的化合物和一种或多种分析物分子(例如生物分子)的组合物。还提供了这类组合物在分析方法中用于检测一种或多种生物分子的用途。

[0027] 一些另外的实施方案包括包含结构(I)的化合物和环糊精的组合物。

[0028] 在一些其它不同的实施方案中,提供了用于确定样品中死细胞的存在的方法,所述方法包含使所述样品与结构(I)的化合物接触,从而使所述化合物与死细胞结合或缔合,并观察来自与所述死细胞结合或缔合的化合物的荧光信号。

[0029] 参考以下详细描述,本发明的这些和其它方面将是显而易见的。

[0030] 详细描述

[0031] 在以下描述中,阐述某些具体细节,旨在提供对本发明多种实施方案的透彻理解。但是,本领域技术人员将理解本发明可以在没有这些细节的情况下实施。

[0032] 除非情境需要,否则在本说明书和权利要求通篇范围内,词“包含”及其变例,如,“包含了”和“包含着”将解释成是开放、包括性意义,即,理解为“包括但不限于”。

[0033] 本说明书通篇范围内对“一个实施方案”或“某个实施方案”的谈及意指在本发明的至少一个实施方案中包含与某实施方案联系所描述的具体特点、结构或特征。因此,短语



“在一个实施方案中”或“在某个实施方案中”在本说明书通篇范围内多个位置的出现并不必然地全都指相同的实施方案。另外,具体特点、结构或特征可以在一个或多个实施方案中按任何适合的方式组合。

[0034] “氨基”指-NH<sub>2</sub>基团。

[0035] “羧基”指-CO<sub>2</sub>H基团。

[0036] “氰基”指-CN基团。

[0037] “甲酰基”指-C(=O)H基团。

[0038] “羟”或“羟基”指OH基团。

[0039] “亚胺基”指=NH基团。

[0040] “硝基”指-NO<sub>2</sub>基团。

[0041] “氧代”指=O取代基。

[0042] “巯基”指-SH基团。

[0043] “硫代”指=S基团。

[0044] “烷基”指仅由碳原子和氢原子组成的直链或支链烃链基团,其不包含不饱和度,具有1至12个碳原子(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>烷基)、1至8个碳原子(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基)或1至6个碳原子(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基),并且通过单键与分子的其余部分连接,例如,甲基、乙基、正丙基、1-甲基乙基(异丙基)、正丁基、正戊基、1,1-二甲基乙基(叔丁基)、3-甲基己基、2-甲基己基等。除非在本说明书中另有声明,否则烷基是任选地被取代的。

[0045] “亚烷基”或“亚烷基链”指仅由碳和氢组成的直链或支链二价烃链,其将分子的其余部分与基团(radical group)连接,其不含有不饱和度并且具有1至12个碳原子,例如,亚甲基、亚乙基、亚丙基、亚正丁基、亚乙烯基、亚丙烯基、亚正丁烯基、亚丙炔基、亚正丁炔基等。亚烷基链通过单键与分子的其余部分连接并通过单键与基团连接。亚烷基链与分子其余部分及与基团的连接点可以是经过链内部的一个碳或任何两个碳。除非在本说明书中另有声明,否则亚烷基是任选地被取代的。

[0046] “亚烯基”或“亚烯基链”是指仅由碳和氢组成的直链或支链二价烃链,其将分子的其余部分与基团(radical group)连接,其含有至少一个碳-碳双键且具有2至12个碳原子,例如亚乙烯基,亚丙烯基,亚正丁烯基等。亚烯基链通过单键与分子的其余部分连接并通过双键或单键与基团连接。亚烯基链与分子的其余部分和基团的连接点可以通过链内的一个碳或任何两个碳。除非在本说明书中另有具体说明,否则亚烯基是任选地被取代的。

[0047] “亚炔基”或“亚炔基链”是指仅由碳和氢组成的直链或支链二价烃链,其将分子的其余部分与基团(radical group)连接,其含有至少一个碳-碳三键且具有2至12个碳原子,例如亚乙烯基,亚丙烯基,亚正丁烯基等。亚炔基链通过单键与分子的其余部分连接并通过双键或单键与基团连接。亚炔基链与分子的其余部分和基团的连接点可以通过链内的一个碳或任何两个碳。除非在本说明书中另有具体说明,否则亚炔基是任选地被取代的。

[0048] “烷基醚”指如上文定义的任何烷基,其中至少一个碳-碳键被碳-氧键替代。碳-氧键可以在末端上(如在烷氧基中)或碳氧键可以是内部的(即,C-O-C)。烷基醚包括至少一个碳氧键,但是可以包括多于一个的碳氧键。例如,在烷基醚的含义内包括聚乙二醇(PEG)。除非在本说明书中另有声明,否则烷基醚基团是任选地被取代的。例如,在一些实施方案中,烷基醚被醇或-OP(=R<sub>a</sub>)(R<sub>b</sub>)R<sub>c</sub>取代,其中R<sub>a</sub>、R<sub>b</sub>和R<sub>c</sub>各自如对结构(I)的化合物所定义。

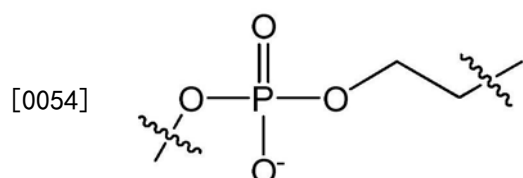
[0049] “烷氧基”指式-OR<sub>a</sub>的基团,其中R<sub>a</sub>是如上文定义的含有1至12个碳原子的烷基。除非在本说明书中另有声明,否则烷氧基是任选地被取代的。

[0050] “烷氧基烷基醚”是指式-OR<sub>a</sub>R<sub>b</sub>的基团,其中R<sub>a</sub>是如上所定义的含有1至12个碳原子的亚烷基基团,并且R<sub>b</sub>是如本文所定义的烷基醚基团。除非在本说明书中另有具体说明,否则烷氧基烷基醚基团是任选地被取代的,例如被醇或-OP(=R<sub>a</sub>)(R<sub>b</sub>)R<sub>c</sub>取代,其中R<sub>a</sub>、R<sub>b</sub>和R<sub>c</sub>各自如结构(I)的化合物所定义。

[0051] “杂烷基”是指如上定义的烷基基团,其在烷基基团内或在烷基基团的末端包含至少一个杂原子(例如,N,O,P或S)。在一些实施方案中,杂原子在烷基基团内(即,杂烷基包含至少一个碳-[杂原子]<sub>x</sub>-碳键,其中x为1、2或3)。在其它实施方案中,杂原子位于烷基基团的末端,因此用于将烷基基团连接到分子的其余部分(例如,M1-H-A),其中M1是分子的一部分,H是杂原子,且A是烷基。除非在本说明书中另有具体说明,否则杂烷基基团是任选地被取代的。示例性的杂烷基基团包括环氧乙烷(ethylene oxide)(例如,聚环氧乙烷),任选地包括三价磷-氧键,例如磷酸二酯键。

[0052] “杂烷氧基”是指式-OR<sub>a</sub>的基团,其中R<sub>a</sub>是如上定义的含有1至12个碳原子的杂烷基。除非在本说明书中另有具体说明,否则杂烷氧基是任选地被取代的。

[0053] “亚杂烷基”是指如上定义的亚烷基基团,其在亚烷基链内或在亚烷基链的末端包含至少一个杂原子(例如,N,O,P或S)。在一些实施方案中,杂原子在烷基链内(即,亚杂烷基包含至少一个碳-[杂原子]<sub>x</sub>-碳键,其中x为1、2或3)。在其它实施方案中,杂原子位于亚烷基的末端,因此用于将亚烷基连接到分子的其余部分(例如,M1-H-A-M2,其中M1和M2是分子的一部分,H是杂原子,A是亚烷基)。除非在本说明书中另有具体说明,否则亚杂烷基基团是任选地被取代的。示例性的亚杂烷基连接基团包括环氧乙烷(例如,PEG)连接基和下面所示的连接基:



[0055] “C连接基”

[0056] 上述C-连接基的多聚体包括在亚杂烷基连接基的不同实施方案中。

[0057] “亚杂烯基”是如上述所定义的亚杂烷基,其包含至少一个碳-碳双键。除非在本说明书中另有特别的定义,否则亚杂烯基是任选地被取代的。

[0058] “亚杂炔基”是包含至少一个碳-碳三键的亚杂烷基。除非在本说明书中另有具体说明,否则亚杂炔基是任选地被取代的。

[0059] “杂原子”在涉及“杂原子连接基”时是指由一个或多个杂原子组成的连接基。示例性的杂原子连接基包括选自O、N、P和S的单一原子,和多个杂原子,例如具有式-P(O⁻)(=O)O⁻或-OP(O⁻)(=O)O⁻的连接基,及其多聚体和组合。

[0060] “磷酸酯”指-OP(=O)(R<sub>a</sub>)R<sub>b</sub>基团,其中R<sub>a</sub>是OH、O⁻或OR<sub>c</sub>;且R<sub>b</sub>是OH、O⁻、OR<sub>c</sub>、硫代磷酸酯基团或另外一个磷酸酯基团,其中R<sub>c</sub>是抗衡离子(例如Na⁺等)。

[0061] “磷酸烷基(phosphoalkyl)”是指-OP(=O)(R<sub>a</sub>)R<sub>b</sub>基团,其中R<sub>a</sub>是OH、O⁻或OR<sub>c</sub>;且R<sub>b</sub>是-O烷基,其中R<sub>c</sub>是抗衡离子(例如Na⁺等)。除非在本说明书中另有具体说明,否则磷酸烷

基是任选地被取代的。例如,在某些实施方案中,磷酸烷基中的-O烷基部分任选地被如下基团中的一个或多个取代:羟基、氨基、巯基、磷酸酯、硫代磷酸酯、磷酸烷基、硫代磷酸烷基、磷酸烷基醚、硫代磷酸烷基醚或-OP(=R<sub>a</sub>)(R<sub>b</sub>)R<sub>c</sub>,其中R<sub>a</sub>、R<sub>b</sub>和R<sub>c</sub>各自如对结构(I)的化合物所定义。

[0062] “磷酸烷基醚”是指-OP(=O)(R<sub>a</sub>)R<sub>b</sub>基团,其中R<sub>a</sub>是OH、O<sup>-</sup>或OR<sub>c</sub>;且R<sub>b</sub>是-O烷基醚,其中R<sub>c</sub>是抗衡离子(例如Na<sup>+</sup>等)。除非在本说明书中另有具体说明,否则磷酸烷基醚基是任选地被取代的。例如,在某些实施方案中,磷酸烷基醚基团中的-O烷基醚部分任选地被如下基团中的一个或多个取代:羟基、氨基、巯基、磷酸酯、硫代磷酸酯、磷酸烷基、硫代磷酸烷基、磷酸烷基醚、硫代磷酸烷基醚或-OP(=R<sub>a</sub>)(R<sub>b</sub>)R<sub>c</sub>,其中R<sub>a</sub>、R<sub>b</sub>和R<sub>c</sub>各自如对结构(I)的化合物所定义。

[0063] “硫代磷酸酯”是指-OP(=R<sub>a</sub>)(R<sub>b</sub>)R<sub>c</sub>基团,其中R<sub>a</sub>是O或S,R<sub>b</sub>是OH、O<sup>-</sup>、S<sup>-</sup>、OR<sub>d</sub>或SR<sub>d</sub>;且R<sub>c</sub>是OH、SH、O<sup>-</sup>、S<sup>-</sup>、OR<sub>d</sub>、SR<sub>d</sub>、磷酸酯基团或另外一个硫代磷酸酯基团,其中R<sub>d</sub>是抗衡离子(例如Na<sup>+</sup>等),且条件是:i)R<sub>a</sub>是S;ii)R<sub>b</sub>是S<sup>-</sup>或SR<sub>d</sub>;iii)R<sub>c</sub>是SH、S<sup>-</sup>或SR<sub>d</sub>;或iv)i)、ii)和/或iii)的组合。

[0064] “硫代磷酸烷基”是指-OP(=R<sub>a</sub>)(R<sub>b</sub>)R<sub>c</sub>基团,其中R<sub>a</sub>是O或S,R<sub>b</sub>是OH、O<sup>-</sup>、S<sup>-</sup>、OR<sub>d</sub>或SR<sub>d</sub>;且R<sub>c</sub>是-O烷基,其中R<sub>d</sub>是抗衡离子(例如Na<sup>+</sup>等),且条件是:i)R<sub>a</sub>是S;ii)R<sub>b</sub>是S<sup>-</sup>或SR<sub>d</sub>;或iii)R<sub>a</sub>是S且R<sub>b</sub>是S<sup>-</sup>或SR<sub>d</sub>。除非在本说明书中另有具体说明,否则硫代磷酸烷基是任选地被取代的。例如,在某些实施方案中,硫代磷酸烷基基团中的-O烷基部分任选地被如下基团中的一个或多个取代:羟基、氨基、巯基、磷酸酯、硫代磷酸酯、磷酸烷基、硫代磷酸烷基、磷酸烷基醚、硫代磷酸烷基醚或-OP(=R<sub>a</sub>)(R<sub>b</sub>)R<sub>c</sub>,其中R<sub>a</sub>、R<sub>b</sub>和R<sub>c</sub>各自如对结构(I)的化合物所定义。

[0065] “硫代磷酸烷基醚”是指-OP(=R<sub>a</sub>)(R<sub>b</sub>)R<sub>c</sub>基团,其中R<sub>a</sub>是O或S,R<sub>b</sub>是OH、O<sup>-</sup>、S<sup>-</sup>、OR<sub>d</sub>或SR<sub>d</sub>;且R<sub>c</sub>是-O烷基醚,其中R<sub>d</sub>是抗衡离子(例如Na<sup>+</sup>等),且条件是:i)R<sub>a</sub>是S;ii)R<sub>b</sub>是S<sup>-</sup>或SR<sub>d</sub>;或iii)R<sub>a</sub>是S且R<sub>b</sub>是S<sup>-</sup>或SR<sub>d</sub>。除非在本说明书中另有具体说明,否则硫代磷酸烷基醚基是任选地被取代的。例如,在某些实施方案中,硫代磷酸烷基中的-O烷基醚部分任选地被如下基团中的一个或多个取代:羟基、氨基、巯基、磷酸酯、硫代磷酸酯、磷酸烷基、硫代磷酸烷基、磷酸烷基醚、硫代磷酸烷基醚或-OP(=R<sub>a</sub>)(R<sub>b</sub>)R<sub>c</sub>,其中R<sub>a</sub>、R<sub>b</sub>和R<sub>c</sub>各自如对结构(I)的化合物所定义。

[0066] “碳环”是指包含3至18个碳原子的稳定的3至18元芳族或非芳族环。除非在本说明书中另有具体说明,否则碳环可以是单环、双环、三环或四环环系,其可以包括稠合或桥连环系,且可以是部分或完全饱和的。非芳族碳环基团包括环烷基,而芳族碳环基团包括芳基。除非在本说明书中另有具体说明,否则碳环基团是任选地被取代的。

[0067] “环烷基”是指稳定的非芳族单环或多环碳环,其可以包括稠合或桥连环系,具有3至15个碳原子,优选具有3至10个碳原子,且其是饱和或不饱和的并且通过单键与分子的其余部分连接。单环环烷基包括例如环丙基,环丁基,环戊基,环己基,环庚基和环辛基。多环环烷基包括例如金刚烷基,降冰片基,十氢萘基,7,7-二甲基-二环-[2.2.1]庚基等。除非在本说明书中另有具体说明,否则环烷基是任选地被取代的。

[0068] “芳基”是指包含至少一个碳环芳族环的环系。在一些实施方案中,芳基包含6至18个碳原子。芳基环可以是单环、双环、三环或四环环系,其可以包括稠合或桥连环系。芳基包

包括但不限于衍生自醋蒽烯(aceanthrylene), 苾, 醋菲烯(acephenanthrylene), 蒽, 甘菊环, 苯, **葑**, 荧蒽, 芴, 不对称-引达省(indacene), 对称-引达省, 茛满, 茛, 蔡, 非那烯(phenalene), 菲, 七曜烯(pleiadene), 芘, 菲和苯并菲的芳基。除非在本说明书中另有具体说明, 否则芳基是任选地被取代的。

[0069] “杂环”是指包含1至12个碳原子和1至6个选自氮、氧和硫的杂原子的稳定的3至18元芳族或非芳族环。除非在本说明书中另有具体说明,否则杂环可以是单环、双环、三环或四环环系,其可以包括稠合或桥连环系;且杂环中的氮、碳或硫原子可以任选地被氧化;氮原子可以任选地被季铵化;且杂环可以是部分或完全饱和的。芳族杂环的实例在下面的杂芳基的定义中列出(即,杂芳基是杂环的子集)。非芳族杂环的实例包括但不限于二氧戊环基,噻吩基[1,3]二噻烷基,十氢异喹啉基,咪唑啉基,咪唑烷基,异噻唑烷基,异噁唑烷基,吗啉基,八氢吲哚基,八氢异吲哚基,2-氧代哌嗪基,2-氧代哌啶基,2-氧代吡咯烷基,噁唑烷基,哌啶基,哌嗪基,4-哌啶酮基,吡咯烷基,吡唑烷基,吡唑并嘧啶基,奎宁环基,噻唑烷基,四氢呋喃基,三噁烷基,三噻烷基,三氮烷基(triazinanyl),四氢吡喃基,硫代吗啉基(thiomorpholinyl),硫杂吗啉基(thiamorpholinyl),1-氧代-硫代吗啉基和1,1-二氧代-硫代吗啉基。除非在本说明书中另有具体说明,否则杂环基团是任选地被取代的。

[0070] “杂芳基”是指5至14元环系,其包含1至13个碳原子,1至6个选自氮、氧和硫的杂原子,和至少一个芳环。对于本发明的某些实施方案的目的,杂芳基可以是单环、双环、三环或四环环系,其可以包括稠合或桥环体系;且杂芳基中的氮、碳或硫原子可以任选地被氧化:氮原子可任选地被季铵化。实例包括,但不限于,吡啶基,吡啶基,苯并咪唑基,苯并噻唑基,苯并呋喃基,苯并间二氧杂环戊烯基,苯并呋喃基,苯并噻唑基,苯并噻唑基,苯并噻二唑基,苯并[b][1,4]二噻庚因基,1,4-苯并二噻烷基,苯并萘并呋喃基,苯并噻唑基,苯并间二氧杂环戊烯基,苯并二噻英基,苯并吡喃基,苯并吡喃酮基,苯并呋喃基,苯并呋喃酮基,苯并噻吩基(苯并噻吩基),苯并三唑基,苯并[4,6]咪唑并[1,2-a]吡啶基,苯并噻唑啉酮基,苯并咪唑硫酮基,呋唑基,噻吩基,二苯并呋喃基,二苯并噻吩基,呋喃基,呋喃酮基,异噻唑基,咪唑基,吡唑基,吡唑基,吡唑基,异吡唑基,二氢吡唑基,异二氢吡唑基,异噻吩基,吡唑基,异噻唑基,萘啶基,噻二唑基,2-氧代吡啶基,噻唑基,环氧乙烷基,1-氧化吡啶基,1-氧化嘧啶基,1-氧化吡嗪基,1-氧代哒嗪基,1-苯基-1H-吡咯基,吩嗪基,吩噻嗪基,吩噻嗪基,酞嗪基,蝶啶基,蝶啶酮基,嘌呤基,吡咯基,吡唑基,吡啶基,吡啶酮基,吡嗪基,嘧啶基,嘧啶酮基,哒嗪基,吡咯基,吡啶并[2,3-d]嘧啶酮基,噻唑啉基,噻唑啉酮基,噻啉基,噻啉酮基,噻啉基,异噻啉基,四氢噻啉基,噻唑基,噻二唑基,噻吩并[3,2-d]嘧啶-4-酮基,噻吩并[2,3-d]嘧啶-4-酮基,三唑基,四唑基,三嗪基和噻吩基(即噻吩)。除非在本说明书中另有具体说明,否则杂芳基是任选地被取代的。

[0071] “稠合”是指包含至少两个环的环系,其中两个环共用至少一个共同的环原子,例如两个共同的环原子。当稠合环是杂环基环或杂芳基环时,共同的环原子可以是碳或氮。稠合环包括双环、三环、四环等。

[0072] 本文所用的术语“取代的”是指任何上述基团(例如烷基、亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚杂烯基、亚杂炔基、烷氧基、烷基醚、烷氧基烷基醚、杂烷基、杂烷氧基、磷酸烷基、磷酸烷基醚、硫代磷酸烷基、硫代磷酸烷基醚、碳环、环烷基、芳基、杂环和/或杂芳基), 其中至少一个氢原子(例如1、2、3个或所有氢原子)被与非氢原子的键替代, 所述非氢原子

例如为但不限于：卤素原子如F, Cl, Br和I；基团如羟基，烷氧基和酯基中的氧原子；基团如巯基，烷硫基，砒基，磺酰基，亚砒基中的硫原子；基团如胺，酰胺，烷基胺，二烷基胺，芳基胺，烷基芳基胺，二芳基胺，N-氧化物，酰亚胺和烯胺中的氮原子；基团如三烷基甲硅烷基，二烷基芳基甲硅烷基，烷基二芳基甲硅烷基基团和三芳基甲硅烷基中的硅原子；以及各种其它基团中的其它杂原子。“取代的”还表示任何上述基团，其中一个或多个氢原子被更高级键（例如双键或三键）替代为杂原子，例如氧代，羰基，羧基和酯基中的氧；和基团如亚胺，肟，肟和肟中的氮。例如，“取代的”包括任何上述基团，其中一个或多个氢原子被如下基团替代： $-\text{NR}_g\text{R}_h$ 、 $-\text{NR}_g\text{C}(=\text{O})\text{R}_h$ 、 $-\text{NR}_g\text{C}(=\text{O})\text{NR}_g\text{R}_h$ 、 $-\text{NR}_g\text{C}(=\text{O})\text{OR}_h$ 、 $-\text{NR}_g\text{SO}_2\text{R}_h$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})\text{NR}_g\text{R}_h$ 、 $-\text{OR}_g$ 、 $-\text{SR}_g$ 、 $-\text{SOR}_g$ 、 $-\text{SO}_2\text{R}_g$ 、 $-\text{OSO}_2\text{R}_g$ 、 $-\text{SO}_2\text{OR}_g$ 、 $=\text{NSO}_2\text{R}_g$ 和 $-\text{SO}_2\text{NR}_g\text{R}_h$ 。“取代的”还是指任何上述基团，其中一个或多个氢原子被如下基团替代： $-\text{C}(=\text{O})\text{R}_g$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{OR}_g$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}_g\text{R}_h$ 、 $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{R}_g$ 、 $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{NR}_g\text{R}_h$ 。上述中， $\text{R}_g$ 和 $\text{R}_h$ 相同或不同且独立地为氢、烷基、烷氧基、烷基氨基、烷硫基、芳基、芳烷基、环烷基、环烷基烷基、卤代烷基、杂环基、N-杂环基、杂环基烷基、杂芳基、N-杂芳基和/或杂芳基烷基。“取代的”还指任何上述基团，其中一个或多个氢原子被与如下基团的键替代：氨基、氰基、羟基、亚氨基、硝基、氧代、硫代、卤代、烷基、烷氧基、烷基氨基、烷硫基、芳基、芳烷基、环烷基、环烷基烷基、卤代烷基、杂环基、N-杂环基、杂环基烷基、杂芳基、N-杂芳基和/或杂芳基烷基。在一些实施方案中，任选的取代基是 $-\text{OP}(=\text{R}_a)(\text{R}_b)\text{R}_c$ ，其中 $\text{R}_a$ 、 $\text{R}_b$ 和 $\text{R}_c$ 各自如结构(I)的化合物所定义。此外，上述取代基各自还可以任选地被上述取代基的一个或多个取代。

[0073] “共轭”指一个p-轨道与另一个p-轨道跨居间的键 $\sigma$ 键重叠。共轭可以出现在环状或非环化合物中。“共轭度”指至少一个p-轨道与另一个p-轨道跨居间的键重叠。例如，1, 3-丁二烯具有一个共轭度，而苯和其它芳族化合物典型地具有多个共轭度。荧光和有色化合物典型地包含至少一个共轭度。

[0074] “荧光”指能够吸收特定频率的光并发射不同频率的光的分子。荧光是本领域普通技术人员熟知的。

[0075] “有色”指吸收有色光谱（即，红色、黄色、蓝色等）内的光的分子。

[0076] “连接基”指至少一个原子如碳、氧、氮、硫、磷及其组合的连续链，其将分子的一部分连接至相同分子的另一个部分或连接至不同分子、部分或固体支持物（例如微粒）。连接基可以经共价键或其它方式如离子或氢键相互作用连接分子。

[0077] 术语“生物分子”指多种生物物质的任意一种，所述生物物质包括核酸、碳水化合物、氨基酸、多肽、糖蛋白、激素、适配体及其混合物。更具体地，该术语意在包括但不限于RNA、DNA、寡核苷酸、修饰或衍生化的核苷酸、酶、受体、朊病毒、受体配体（包括激素）、抗体、抗原和毒素，以及细菌、病毒、血细胞和组织细胞。如本文进一步描述的，通过以下方式制备本发明的视觉可检测的生物分子（即，与生物分子连接的结构(I)的化合物）：使生物分子与具有反应性基团的化合物接触，所述反应性基团能够借助生物分子上的任何可用原子或官能团如氨基、羟基、羧基或巯基，使该生物分子与化合物连接。

[0078] “反应性基团”是能够与第二反应性基团（例如“互补反应性基团”）反应形成一个或多个共价键的部分，例如通过置换，氧化，还原，加成或环加成反应。示例性的反应性基团提供在表1中，且包括例如，亲核试剂，亲电试剂，二烯，亲双烯体，醛，肟，肟，炔烃，胺，叠氮化物，酰基叠氮化物，酰基卤，腈，硝酮，巯基，二硫化物，磺酰卤，异硫氰酸酯，亚氨酸酯，活

化酯,酮, $\alpha$ , $\beta$ -不饱和羰基,烯烃,马来酰亚胺, $\alpha$ -卤代酰亚胺,环氧化物,氮丙啶,四嗪,四唑,磷,生物素,硫杂丙环等。

[0079] 术语“可视的”和“视觉可检测的”在本文中用来指没有事先光照或化学或酶促激活情况下通过视觉检查可观察的物质。这类视觉可检测的物质在范围从约300nm至约900nm的光谱区吸收并发光。优选地,这类物质强烈有色,优选地具有至少约40,000、更优选地至少约50,000、仍然更优选地至少约60,000、仍更优选地至少约70,000和最优选地至少约80,000M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>的摩尔消光系数。可以通过用肉眼观察或借助基于光学的检测装置(包括但不限于,吸收分光光度计、透射光学显微镜、数码照相机和扫描仪)检测到本发明的化合物。视觉可检测的物质不限于在可见光谱发射和/或吸收光的那些。“视觉可检测的”物质的范围内还包括在紫外(UV)区(约10nm至约400nm)、红外(IR)区(约700nm至约1mm)发射和/或吸收光的物质和在其它电磁波谱区发射和/或吸收的物质。

[0080] 为了本发明的目的,术语“光稳定的可视染料”指如上文所定义那样视觉可检测并且当暴露于光时没有显著改变或分解的化学部分。优选地,在暴露于光至少1小时后,光稳定的可视染料不显示明显的漂白作用或分解。更优选地,在暴露于光至少12小时、仍然更优选地至少24小时、然而仍更优选地至少1周和最优选地至少1个月后,可视染料稳定。适用于本发明化合物和方法中的光稳定的可视染料的非限制性例子包含偶氮染料、硫靛蓝染料、喹吖啶酮颜料、二噁嗪、酞菁、茚酮(perinone)、二酮吡咯并吡咯、喹酞酮和truarycarbonium。

[0081] 如本文所用,术语“花衍生物”意在包括视觉可检测的任何取代的花。然而,该术语不意在包括花本身。类似地使用术语“葱衍生物”、“萘衍生物”和“茈衍生物”。在一些优选的实施方案中,衍生物(例如,茈衍生物、茈衍生物、葱衍生物或萘衍生物)是茈、葱、萘或茈的酰亚胺、双酰亚胺或肼酰亚胺(hydrazamimide)衍生物。

[0082] 本发明各种实施方案的视觉可检测的分子可用于广泛的各种分析应用,例如生物化学和生物医学应用,其中需要确定特定分析物(例如生物分子)的存在、位置或数量。在另一个方面,因此,本发明提供一种用于视觉检测生物分子的方法,所述方法包括:(a)向生物系统提供视觉可检测的生物分子,其包含与生物分子连接的结构(I)的化合物;且(b)通过其可视性质检测生物分子。为了本发明的目的,短语“通过其可视性质检测生物分子”意指在没有光照或化学或酶促激活的情况下用肉眼或借助基于光学的检测装置观察生物分子,所述检测装置包括但不限于吸收分光光度计、透射光学显微镜、数码照相机和扫描仪。光密度计可以用来对存在的视觉可检测的生物分子的量定量。例如,可以通过测量相对光学密度确定两份样品中生物分子的相对量。如果已知染料分子/生物分子的化学计量并已知染料分子的消光系数,则也可以从光学密度的量值确定生物分子的绝对浓度。如本文所用,术语“生物系统”是用来指除视觉可检测生物分子之外还包含一种或多种生物分子的任何溶液或混合物。这类生物系统的非限制性例子包括细胞、细胞提取物、组织样品、电泳凝胶、分析混合物和杂交反应混合物。

[0083] “固体支持物”是指本领域已知的用于分子固相支持的任何固体基质,例如,“微粒”指任何可用于连接本发明化合物的小颗粒,包括但不限于,玻璃珠粒,磁性珠粒,聚合物珠粒,非聚合物珠粒等。在某些实施方案中,微粒包含聚苯乙烯珠粒。

[0084] “固体支持物残基”是指当分子从固体支持物上裂解时保持与分子连接的官能团。

固体支持物残基是本领域已知的,且可以基于固体支持物的结构和连接分子的基团容易地得到。

[0085] “靶向部分”是与特定靶标例如分析物分子选择性地结合或缔合的部分。“选择性地”结合或缔合意指靶向部分相对于其它靶标优先与期望的靶标缔合或结合。在一些实施方案中,本文公开的化合物包括与靶向部分的连接,目的是选择性地使化合物与感兴趣的分析物(即靶向部分的靶标)结合或缔合,从而允许检测分析物。示例性靶向部分包括但不限于抗体,抗原,核酸序列,酶,蛋白质,细胞表面受体拮抗剂等。在一些实施方案中,靶向部分是选择性地与细胞上或细胞内的靶特征(例如细胞膜或其它细胞结构上的靶特征)结合或缔合的部分,例如抗体,从而允许检测感兴趣的细胞。在某些实施方案中,还考虑将与所需分析物选择性地结合或缔合的小分子作为靶向部分。本领域技术人员将理解其它分析物和相应的靶向部分可用于各种实施方案中。

[0086] “碱基配对部分”是指能够通过氢键与互补杂环部分杂交的杂环部分(例如沃森-克里克(Watson-Crick)碱基配对)。碱基配对部分包括天然和非天然碱基。碱基配对部分的非限制性实例是RNA和DNA碱基,例如腺苷,鸟苷,胸苷,胞嘧啶和尿苷及其类似物。

[0087] 本文公开的发明还意在涵盖通过一个或多个原子被具有不同原子质量或质量数的原子替换而进行同位素标记的全部的结构(I)的化合物。可以掺入所公开化合物的同位素的例子分别包括氢、碳、氮、氧、磷、氟、氯和碘的同位素,如 $^2\text{H}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{11}\text{C}$ 、 $^{13}\text{C}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{13}\text{N}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{15}\text{O}$ 、 $^{17}\text{O}$ 、 $^{18}\text{O}$ 、 $^{31}\text{P}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{36}\text{Cl}$ 、 $^{123}\text{I}$ 和 $^{125}\text{I}$ 。

[0088] 同位素标记的结构(I)的化合物通常可以通过本领域技术人员已知的常规技术或通过与下文和以下实施例中所描述的那些相似的方法,使用适宜的同位素标记试剂而非先前所用的非标记试剂来制备。

[0089] “稳定的化合物”和“稳定的结构”意指这样的化合物,所述化合物充分稳健以承受从反应混合物分离至有用纯度和配制成有效治疗剂。

[0090] 术语“任选的”或“任选地”意指随后描述的事件或环境可能出现或可能不出现,并且这种描述包括其中所述事件或环境出现的情况及其中它不出现的情况。例如,“任选地取代的烷基”意指烷基可以是取代的或可以是未取代的并且该描述包括取代的烷基和没有取代的烷基。

[0091] “盐”包括酸加成盐和碱加成盐。

[0092] “酸加成盐”指与无机酸和与有机酸形成的那些盐,所述无机酸例如是但不限于氢氯酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸等,所述有机酸例如是但不限于乙酸、2,2-二氯乙酸、己二酸、海藻酸、抗坏血酸、天冬氨酸、苯磺酸、苯甲酸、4-乙酰氨基苯甲酸、樟脑酸、樟脑-10-磺酸、癸酸、己酸、辛酸、碳酸、肉桂酸、柠檬酸、环己烷氨基磺酸、十二烷基硫酸、乙烷-1,2-二磺酸、乙磺酸、2-羟基乙磺酸、甲酸、富马酸、半乳糖二酸、龙胆酸、葡庚糖酸、葡糖酸、葡糖醛酸、谷氨酸、戊二酸、2-氧代-戊二酸、甘油磷酸、乙醇酸、马尿酸、异丁酸、乳酸、乳糖酸、月桂酸、马来酸、苹果酸、丙二酸、扁桃酸、甲磺酸、粘酸、萘-1,5-二磺酸、萘-2-磺酸、1-羟基-2-萘酸、烟酸、油酸、乳清酸、草酸、棕榈酸、扑酸(pamoic acid)、丙酸、焦谷氨酸、丙酮酸、水杨酸、4-氨基水杨酸、癸二酸、硬脂酸、琥珀酸、酒石酸、硫氰酸、对甲苯磺酸、三氟乙酸、十一碳烯酸等。

[0093] “碱加成盐”指从添加无机碱或有机碱至游离酸所制备的那些盐。衍生自无机碱的

盐包括但不限于钠盐、钾盐、锂盐、铵盐、钙盐、镁盐、铁盐、锌盐、铜盐、锰盐、铝盐等。衍生自有机碱的盐包括但不限于以下的盐：伯胺、仲胺和叔胺、取代胺（包括天然存在的取代胺）、环状胺和碱性离子交换树脂，如氨、异丙胺、三甲胺、二乙胺、三乙胺、三丙胺、二乙醇胺、乙醇胺、丹醇、2-二甲基氨基乙醇、2-二乙基氨基乙醇、二环己基胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、咖啡因、普鲁卡因、哈胺 (hydrabamine)、胆碱、甜菜碱、苯乙苄胺、苄星 (benzathine)、乙二胺、葡糖胺、甲基葡糖胺、可可碱、三乙醇胺、氨丁三醇、嘌呤、哌嗪、哌啶、N-乙基哌啶、多胺树脂等。特别优选的有机碱是异丙胺、二乙胺、乙醇胺、三甲胺、二环己基胺、胆碱和咖啡因。

[0094] 结晶可以产生本发明化合物的溶剂化物。本发明包括所描述化合物的全部溶剂化物。如本文所用，术语“溶剂化物”指包含一个或多个分子的本发明化合物与一个或多个分子的溶剂的聚集体。溶剂可以是水，在这种情况下溶剂化物可以是水合物。可选地，溶剂可以是有机溶剂。因此，本发明的化合物可以作为水合物存在，包括一水合物、二水合物、半水合物、倍半水合物、三水合物、四水合物等以及相应的溶剂化形式。本发明的化合物可以是真溶剂化物，而在其它情况下，本发明的化合物可以仅保留外来水或另一种溶剂或是水加上一些外来溶剂的混合物。

[0095] 本发明的化合物（例如结构I的化合物）或其盐、互变异构体或溶剂化物的实施方案可以含有一个或多个非对称中心，并且因此可以产生对映异构体、非对映异构体及其它立体异构形式，其根据绝对立体化学可以定义为(R)-或(S)-，或对于氨基酸可以定义为(D)-或(L)-。本发明意在包括全部这类可能的异构体以及其外消旋形式和光学纯形式。光学活性的(+)和(-)、(R)-和(S)-或(D)-和(L)-异构体可以使用手性合成子或手性试剂制备，或使用常规技术例如色谱和分级结晶拆分。用于制备/分离各种对映异构体的常规技术包括从适合的光学纯前体中手性合成或例如使用手性高压液相色谱(HPLC)拆分外消旋物（或盐或衍生物的外消旋物）。当本文所述的化合物含有烯属双键或其它几何非对称性中心时并且除非另外说明指定，否则该化合物意在包括E和Z几何异构体。同样，还意在包括全部互变异构形式。

[0096] “立体异构体”是指由通过相同键键合的相同原子构成的但是具有不可互换的不同三维结构的化合物。本发明构思了多种立体异构体及其混合物并且包括“对映异构体”，所述对映异构体指的是其分子是彼此不可叠加的镜像的两种立体异构体。

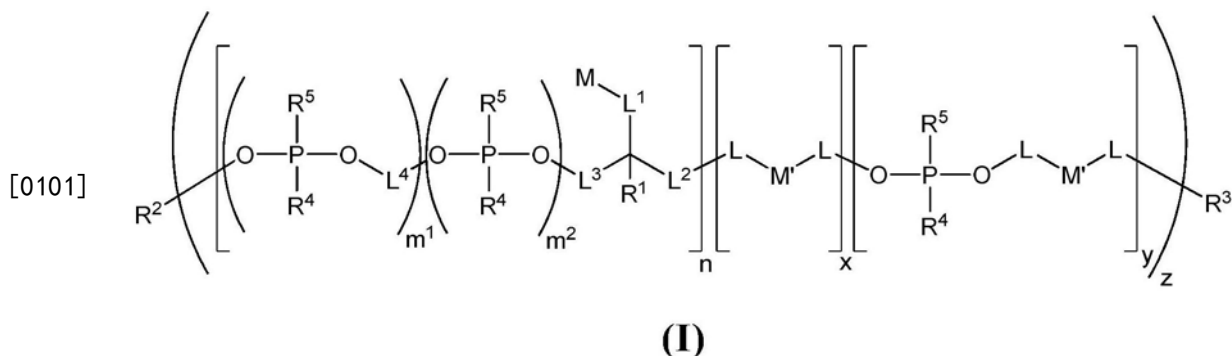
[0097] “互变异构体”是指质子从分子的一个原子移动至同一分子的另一个原子。本发明包括任何所述化合物的互变异构体。化合物的多种互变异构形式可由本领域普通技术人员容易地衍生。

[0098] 使用ACD/命名9.07版软件程序和/或ChemDraw Ultra第11.0版软件命名程序(CambridgeSoft)，本文所用的化学命名方案和结构简图是I.U.P.A.C.命名系统的修订形式。还使用本领域普通技术人员熟悉的通用名。

[0099] 如上所述，在本发明的一个实施方案中，提供了在各种分析方法中用作荧光和/或有色染料的化合物。一般而言，本发明的实施方案涉及荧光和/或有色部分的二聚体和更高聚合物。荧光和/或有色部分通过含磷的键连接。不希望受理论束缚，据信连接基有助于在荧光和/或有色部分之间保持足够的空间距离，从而减少或消除分子内猝灭，从而产生具有高摩尔“亮度”（例如高荧光发射）的染料化合物。有利地，在某些实施方案中，连接基增加通常是疏水的和水溶性差的荧光和/或有色部分的水溶性。



[0100] 在一些实施方案中,提供了具有以下结构(I)的化合物:



[0102] 或其立体异构体、盐或互变异构体,其中:

[0103] M在每次出现时独立地为包含两个或更多个碳-碳双键和至少一个共轭度的一价部分;

[0104] M'在每次出现时独立地为包含两个或更多个碳-碳双键和至少一个共轭度的二价部分;

[0105] L、L<sup>2</sup>和L<sup>3</sup>在每次出现时独立地为任选的亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚杂烯基、亚杂炔基或杂原子连接基;

[0106] L<sup>1</sup>在每次出现时独立地为:i) 任选的亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚杂烯基、亚杂炔基或杂原子连接基;或ii) 包含能够通过两个互补反应性基团的反应形成的官能团的连接基;

[0107] L<sup>4</sup>在每次出现时独立地为亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚杂烯基、碳环或杂环连接基;

[0108] R<sup>1</sup>在每次出现时独立地为H、烷基或烷氧基;

[0109] R<sup>2</sup>和R<sup>3</sup>各自独立地为H、OH、SH、烷基、烷氧基、烷基醚、杂烷基、-OP(=R<sub>a</sub>)(R<sub>b</sub>)R<sub>c</sub>、Q或L';

[0110] R<sup>4</sup>在每次出现时独立地为OH、SH、O<sup>-</sup>、S<sup>-</sup>、OR<sub>d</sub>或SR<sub>d</sub>;

[0111] R<sup>5</sup>在每次出现时独立地为氧代、硫代或不存在;

[0112] R<sub>a</sub>是O或S;

[0113] R<sub>b</sub>是OH、SH、O<sup>-</sup>、S<sup>-</sup>、OR<sub>d</sub>或SR<sub>d</sub>;

[0114] R<sub>c</sub>是OH、SH、O<sup>-</sup>、S<sup>-</sup>、OR<sub>d</sub>、OL'、SR<sub>d</sub>、烷基、烷氧基、杂烷基、杂烷氧基、烷基醚、烷氧基烷基醚、磷酸酯、硫代磷酸酯、磷酸烷基、硫代磷酸烷基、磷酸烷基醚或硫代磷酸烷基醚;

[0115] R<sub>d</sub>是抗衡离子;

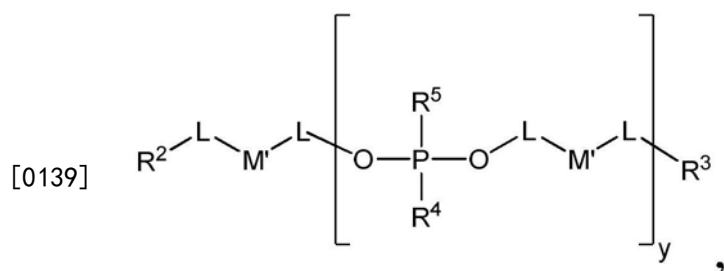
[0116] Q在每次出现时独立地为包含反应性基团或其被保护的类似物的部分,其能够与分析物分子、靶向部分、固体支持物或互补反应性基团Q'形成共价键;

[0117] L'在每次出现时独立地为包含与Q的共价键的连接基,包含与靶向部分的共价键的连接基,包含与分析物分子的共价键的连接基,包含与固体支持物的共价键的连接基,包含与固体支持物残基的共价键的连接基,包含与核苷的共价键的连接基或包含与结构(I)的其它化合物的共价键的连接基;

[0118] m<sup>1</sup>和m<sup>2</sup>在每次出现时独立地为0或更大的整数;

[0119] 对于z的每个整数值,n、x和y各自独立地为0或更大的整数;且

- [0120]  $z$ 为1或更大的整数,
- [0121] 条件是,对于 $z$ 的至少一个整数值, $x$ 为1或更大,且对于 $z$ 的至少一个整数值, $n$ 或 $y$ 的至少一个是1或更大。
- [0122] 在结构(I)的另外的实施方案中:
- [0123]  $M$ 在每次出现时独立地为包含两个或更多个碳-碳双键和至少一个共轭度的一价部分;
- [0124]  $M'$ 在每次出现时独立地为包含两个或更多个碳-碳双键和至少一个共轭度的二价部分;
- [0125]  $L$ 、 $L^2$ 和 $L^3$ 在每次出现时独立地为任选的亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚杂烯基、亚杂炔基或杂原子连接基;
- [0126]  $L^1$ 在每次出现时独立地为:i)任选的亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚杂烯基、亚杂炔基或杂原子连接基;或ii)包含能够通过两个互补反应性基团的反应形成的官能团的连接基;
- [0127]  $L^4$ 在每次出现时独立地为亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚杂烯基、碳环或杂环连接基;
- [0128]  $R^1$ 在每次出现时独立地为H、烷基或烷氧基;
- [0129]  $R^2$ 和 $R^3$ 各自独立地为H、OH、SH、烷基、烷氧基、烷基醚、 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ 、Q、包含与Q的共价键的连接基、包含与分析物分子的共价键的连接基、包含与固体支持物的共价键的连接基或包含与结构(I)的其它化合物的共价键的连接基,其中: $R_a$ 是O或S; $R_b$ 是OH、SH、 $O^-$ 、 $S^-$ 、 $OR_d$ 或 $SR_d$ ; $R_c$ 是OH、SH、 $O^-$ 、 $S^-$ 、 $OR_d$ 、 $SR_d$ 、烷基、烷氧基、烷基醚、烷氧基烷基醚、磷酸酯、硫代磷酸酯、磷酸烷基、硫代磷酸烷基、磷酸烷基醚或硫代磷酸烷基醚;且 $R_d$ 是抗衡离子;
- [0130]  $R^4$ 在每次出现时独立地为OH、SH、 $O^-$ 、 $S^-$ 、 $OR_d$ 或 $SR_d$ ;
- [0131]  $R^5$ 在每次出现时独立地为氧代、硫代或不存在;
- [0132] Q在每次出现时独立地为包含反应性基团的部分,其能够与分析物分子、固体支持物或互补反应性基团Q'形成共价键;
- [0133]  $m^1$ 和 $m^2$ 在每次出现时独立地为0或更大的整数;
- [0134] 对于 $z$ 的每个整数值, $n$ 、 $x$ 和 $y$ 各自独立地为0或更大的整数;且
- [0135]  $z$ 为1或更大的整数,
- [0136] 条件是,对于 $z$ 的至少一个整数值, $x$ 为1或更大,且对于 $z$ 的至少一个整数值, $n$ 或 $y$ 的至少一个是1或更大。
- [0137] 在一些实施方案中,对于 $z$ 的至少一个整数值, $y$ 为1或更大。在其它实施方案中,对于 $z$ 的至少一个整数值, $n$ 为1或更大。
- [0138] 在一些更具体的实施方案中,化合物具有以下结构(IA):



## (IA)

[0140] 其中y是1或更大的整数,例如1-10的整数。

[0141] 选择连接基L以便提供M'基团之间期望的间隔,并且在某些实施方案中,以便给化合物提供增加的水溶性。在一些实施方案中,L<sup>1</sup>在每次出现时独立地为任选的亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚杂烯基、亚杂炔基或杂原子连接基。在另外的实施方案中,L<sup>1</sup>在每次出现时独立地为包含能够通过两个互补反应性基团的反应形成的官能团的连接基,例如Q基团。在某些实施方案中,L在每次出现时独立地为亚烷基连接基,例如C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>亚烷基连接基。在一些实施方案中,L是C<sub>3</sub>连接基,例如亚丙基连接基。

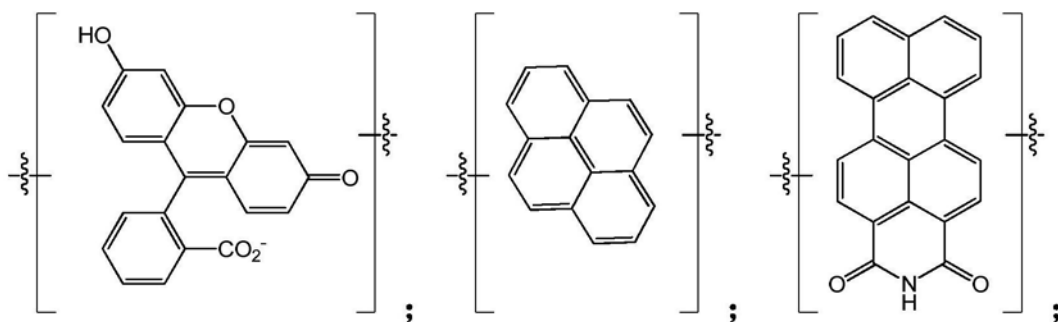
[0142] M'基于期望的最终用途应用来选择。M'是二价部分,意味着它在两个位置与结构(I)的化合物的其余部分连接。在某些实施方案中,M'在每次出现时独立地为二价部分:二甲基氨基苝,喹吖啶酮,氟苯基-二甲基-BODIPY, his-氟苯基-BODIPY,吖啶,三萘嵌二苯(terrylene),联六苯,卟啉,苯并苝,(氟苯基-二甲基-二氟硼杂-二氮杂-引达省)苯基,(双-氟苯基-二氟硼杂-二氮杂-引达省)苯基,四联苯,联苯并噻唑,三联苯并噻唑,联萘,联蒽,方酸类化合物(squaraine),squarylium,9,10-乙炔基蒽或三联萘部分。

[0143] 在不同的实施方案中,M'在每次出现时独立地为二价部分:对三联苯,花,偶氮苯,吩嗪,菲咯啉,吖啶,噻吨, **蒽**,红荧烯,蒽,花青,花酰亚胺,或花酰胺或其衍生物。

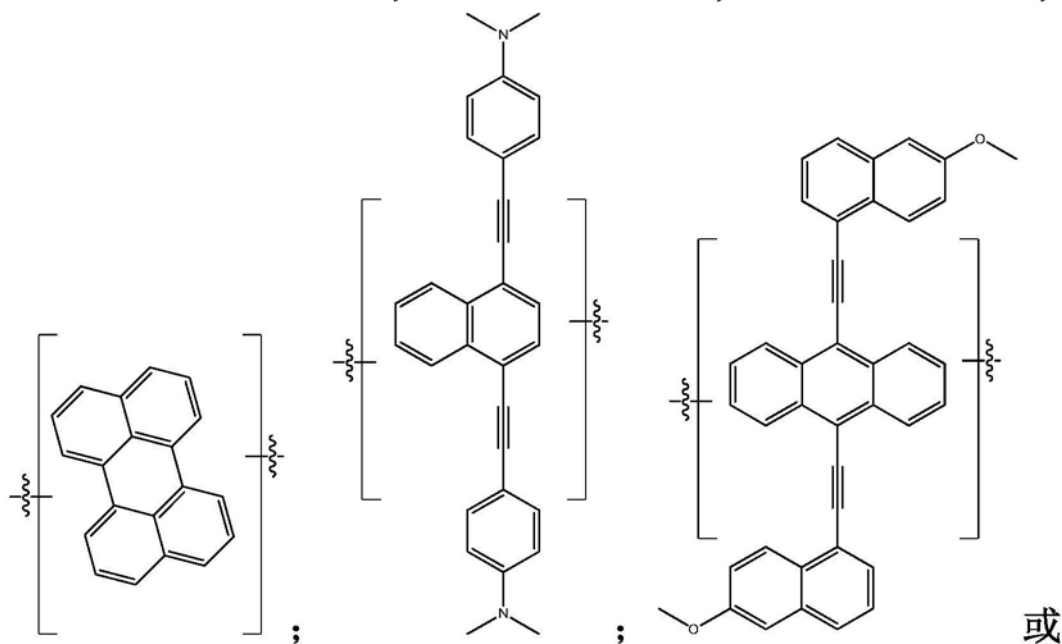
[0144] 在更多的实施方案中,M'在每次出现时独立地为二价部分:香豆素染料,试卤灵染料,二吡咯亚甲基硼二氟化物(dipyrrometheneboron difluoride)染料,钆联吡啶染料,能量转移染料,噻唑橙染料,聚甲炔或N-芳基-1,8-萘二甲酰亚胺染料。

[0145] 在另外的实施方案中,M'在每次出现时独立地为二价部分:苝、花、花一酰亚胺或6-FAM或其衍生物。

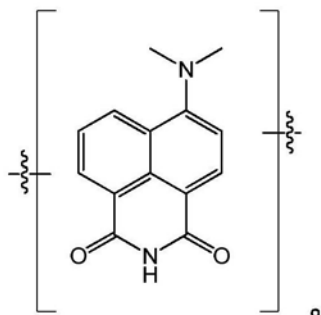
[0146] 在一些另外的具体实施方案中,M'在每次出现时独立地具有以下结构之一:



[0147]



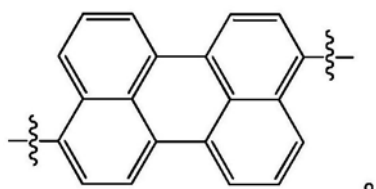
[0148]



[0149] 应理解,括在括号即[ ]内的化合物是二价的,并且在两个位置与结构(I)的化合物的其余部分连接。换句话说,两个氢原子被与L的键替代,或者当L不存在时两个氢原子被适当的基团替代。

[0150] 在一些更具体的实施方案中,M'在每次出现时具有以下结构:

[0151]



[0152] 结构(I)的化合物中的各种连接基和取代基(例如R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、L、L'、L<sup>1</sup>、L<sup>2</sup>、L<sup>3</sup>、L<sup>4</sup>、Q、M和M')任选地被一个或多个取代基取代。在一些实施方案中,选择任选的取代基以优化结构(I)的化合物的水溶性或其它性质。在某些实施方案中,结构(I)的化合物中的烷基,

烷氧基,烷基醚,烷氧基烷醚,磷酸烷基,硫代磷酸烷基,磷酸烷基醚和硫代磷酸烷基醚各自任选地被一个或多个取代基取代,所述取代基选自羟基,烷氧基,烷基醚,烷氧基烷基醚,巯基,氨基,烷基氨基,羧基,磷酸酯,硫代磷酸酯,磷酸烷基,硫代磷酸烷基,磷酸烷基醚和硫代磷酸烷基醚。在某些实施方案中,任选的取代基是 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ ,其中 $R_a$ 、 $R_b$ 和 $R_c$ 如对结构(I)的化合物所定义。

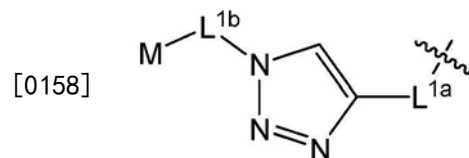
[0153] 连接基 $L^1$ 可以用作M部分与化合物其余部分的连接点。在一些实施方案中,制备结构(I)的化合物的合成前体,并且使用本领域已知的任何数量的简便方法例如称为“点击化学”的方法将M部分连接到合成前体上。为此目的,任何快速和基本上不可逆的反应都可用于将M连接到合成前体上以形成结构(I)的化合物。示例性反应包括铜催化的叠氮化物和炔烃的反应以形成三唑(Huisgen 1,3-偶极环加成),二烯和亲双烯体的反应(第尔斯-阿尔德反应),应变促进的炔烃-硝酮环加成反应,应变烯烃与叠氮化物、四嗪或四唑的反应,烯烃和叠氮化物[3+2]环加成,烯烃和四嗪逆需求(inverse-demand)第尔斯-阿尔德反应,烯烃和四唑光反应和各种置换反应,例如通过对亲电子原子的亲核攻击置换离去基团。示例性的置换反应包括胺与以下物质的反应:活化酯;N-羟基琥珀酰亚胺酯;异氰酸酯;异硫氰酸酯等。在一些实施方案中,形成 $L^1$ 的反应可以在水性环境中进行。

[0154] 因此,在一些实施方案中, $L^1$ 是官能团,其是前述“点击”反应之一的产物。在各种实施方案中,对于至少一次出现的 $L^1$ ,官能团可以通过醛,肟,肟,炔烃,胺,叠氮化物,酰基叠氮化物,酰卤,腈,硝酮,巯基,二硫化物,磺酰卤,异硫氰酸酯,亚氨酸酯,活化酯(例如N-羟基琥珀酰亚胺酯),酮, $\alpha,\beta$ -不饱和羰基,烯烃,马来酰亚胺, $\alpha$ -卤代酰亚胺,环氧化物,氮丙啶,四嗪,四唑,脒,生物素或硫杂丙环官能团与互补反应性基团的反应而形成。例如,胺与N-羟基琥珀酰亚胺酯或异硫氰酸酯的反应。

[0155] 在另外的实施方案中,对于至少一次出现的 $L^1$ ,官能团可以通过炔烃和叠氮化物的反应形成。在另外的实施方案中,对于至少一次出现的 $L^1$ ,官能团可以通过胺(例如伯胺)和N-羟基琥珀酰亚胺酯或异硫氰酸酯的反应形成。

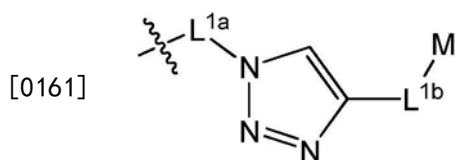
[0156] 在更多的实施方案中,对于至少一次出现的 $L^1$ ,官能团包括烯烃,酯,酰胺,硫酯,二硫化物,碳环,杂环或杂芳基基团。在更多的实施方案中,对于至少一次出现的 $L^1$ ,官能团包括烯烃,酯,酰胺,硫酯,硫脲,二硫化物,碳环,杂环或杂芳基基团。在另外的实施方案中,官能团包括酰胺或硫脲。在一个更具体的实施方案中,对于至少一次出现的 $L^1$ , $L^1$ 是包含三唑基官能团的连接基。在另外的实施方案中,对于至少一次出现的 $L^1$ , $L^1$ 是包含酰胺或硫脲官能团的连接基。

[0157] 在另外的实施方案中,对于至少一次出现的 $L^1$ , $L^1$ -M具有以下结构:



[0159] 其中 $L^{1a}$ 和 $L^{1b}$ 各自独立地为任选的连接基。

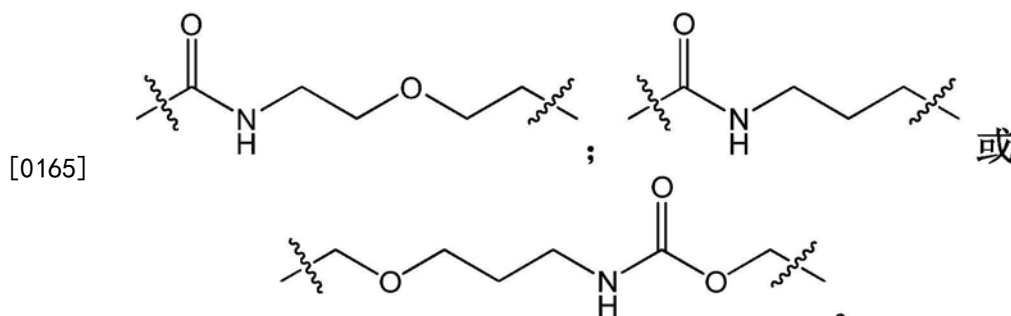
[0160] 在不同的实施方案中,对于至少一次出现的 $L^1$ , $L^1$ -M具有以下结构:



[0162] 其中 $L^{1a}$ 和 $L^{1b}$ 各自独立地为任选的取代基。

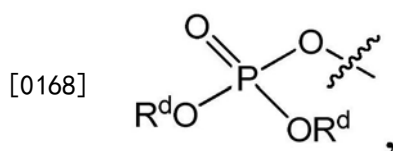
[0163] 在上述不同的实施方案中, $L^{1a}$ 或 $L^{1b}$ 或两者均不存在。在另外的实施方案中, $L^{1a}$ 或 $L^{1b}$ 或两者均存在。

[0164] 在一些实施方案中, $L^{1a}$ 和 $L^{1b}$ 在存在时各自独立地为亚烷基或亚杂烷基。例如,在某些实施方案中, $L^{1a}$ 和 $L^{1b}$ 在存在时独立地具有以下结构之一:



[0166] 在更多的实施方案中, $L^2$ 、 $L^3$ 和 $L^4$ 在每次出现时独立地为 $C_1$ - $C_6$ 亚烷基、 $C_2$ - $C_6$ 亚烯基或 $C_2$ - $C_6$ 亚炔基。在另外的实施方案中, $L^4$ 在每次出现时独立地为 $C_1$ - $C_6$ 亚烷基、 $C_2$ - $C_6$ 亚烯基或 $C_2$ - $C_6$ 亚炔基。在更不同的实施方案中, $L^4$ 是环氧乙烷连接基,例如,三环氧乙烷(triethylene oxide)或六环氧乙烷(hexaethylene oxide)连接基。在另一个不同的实施方案中, $L^4$ 是碳环或杂环连接基,例如,多环、稠合碳环或杂环连接基。

[0167] 在任何前述结构(I)的化合物的其它实施方案中, $R^4$ 在每次出现时独立地为OH、 $O^-$ 或 $OR_d$ 。应理解,“ $OR_d$ ”和“ $SR_d$ ”旨在表示与阳离子缔合的 $O^-$ 和 $S^-$ 。例如,磷酸酯基团的二钠盐可表示为:



[0169] 其中 $R^d$ 是钠( $Na^+$ )。

[0170] 在任何结构(I)的化合物的其它实施方案中, $R^5$ 在每次出现时为氧代。

[0171] 在任何上述化合物的一些不同实施方案中, $R^1$ 是H。

[0172] 在其它不同的实施方案中, $R^2$ 和 $R^3$ 各自独立地为OH或 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ 。在一些不同的实施方案中, $R^2$ 或 $R^3$ 是OH或 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ ,而 $R^2$ 或 $R^3$ 的另一个为Q或为包含与Q的共价键的连接基。

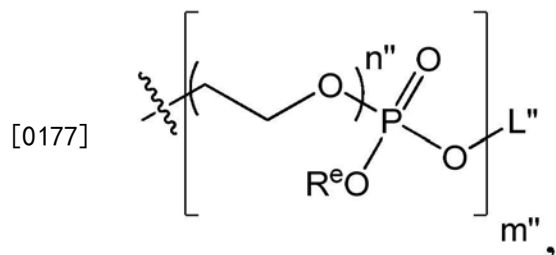
[0173] 在任意上述结构(I)的化合物的更多不同实施方案中, $R^2$ 和 $R^3$ 各自独立地为 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ 。在一些这样的实施方案中, $R_c$ 是 $OL'$ 。

[0174] 在其它实施方案中, $R^2$ 和 $R^3$ 各自独立地为 $-OP(=R_a)(R_b)OL'$ ,且 $L'$ 是连接至如下部分的亚烷基或亚杂烷基连接基:Q、靶向部分、分析物(例如分析物分子)、固体支持物、固体支持物残基、核苷或结构(I)的其它化合物。

[0175] 连接基 $L'$ 可以是适合于将Q、靶向部分,分析物(例如分析物分子),固体支持物,固

体支持物残基,核苷或结构(I)的其它化合物连接至结构(I)的化合物的任何连接基。有利地,某些实施方案包括使用选择的L'部分以增加或优化化合物的水溶性。在某些实施方案中,L'是亚杂烷基部分。在一些其它的某些实施方案中,L'包含烯化氧(alkylene oxide)或磷酸二酯部分或其组合。

[0176] 在某些实施方案中,L'具有以下结构:



[0178] 其中:

[0179] m'和n'独立地为1-10的整数;

[0180] R<sup>e</sup>是H、电子对或抗衡离子;

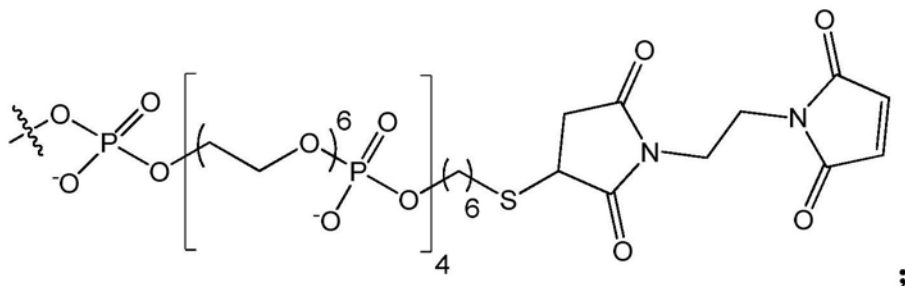
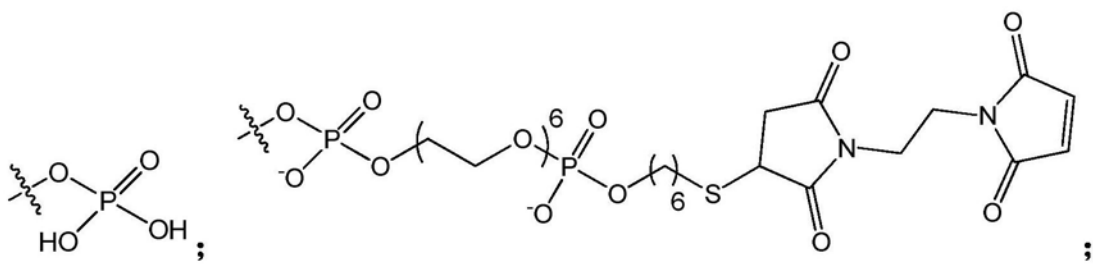
[0181] L''是R<sup>e</sup>或直接键或连接至:Q,靶向部分,分析物(例如分析物分子),固体支持物,固体支持物残基,核苷或结构(I)的其它化合物。

[0182] 在一些实施方案中,m'是4-10的整数,例如4、6或10。在另外的实施方案中,n'是3-6的整数,例如3、4、5或6。

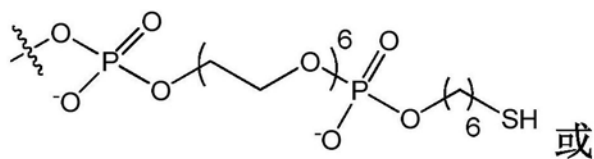
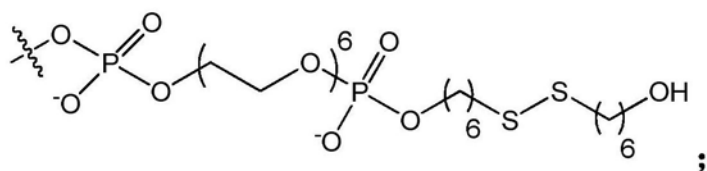
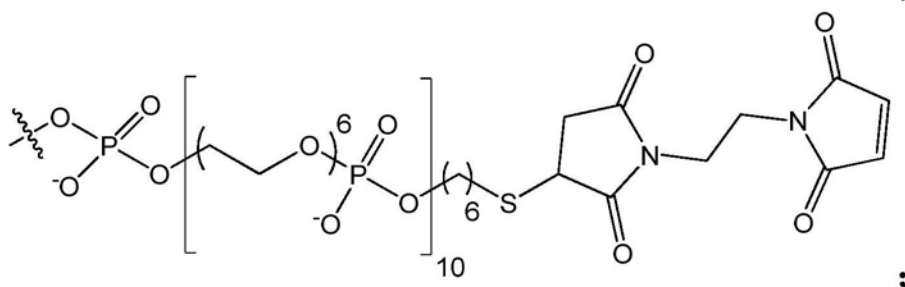
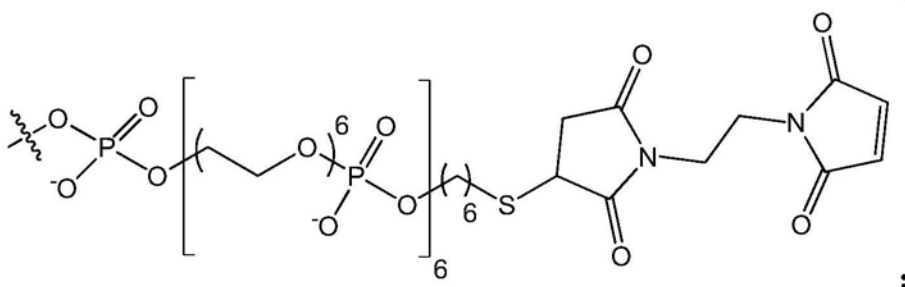
[0183] 在一些另外的实施方案中,L''是亚烷基或亚杂烷基部分。在一些另外的某些实施方案中,L''包含烯化氧、磷酸二酯部分、巯基、二硫化物或马来酰亚胺部分或其组合。

[0184] 在某些上述实施方案中,靶向部分是抗体或细胞表面受体拮抗剂。

[0185] 在任意上述结构(I)的化合物的另外更多的具体实施方案中,R<sup>2</sup>或R<sup>3</sup>具有以下结构之一:

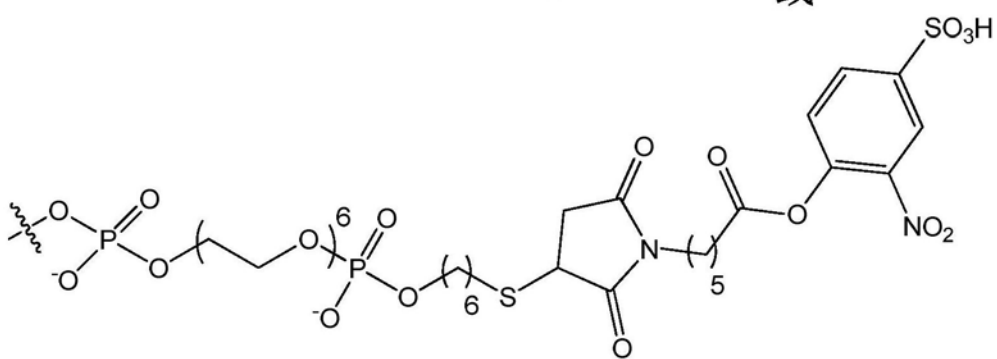


[0186]



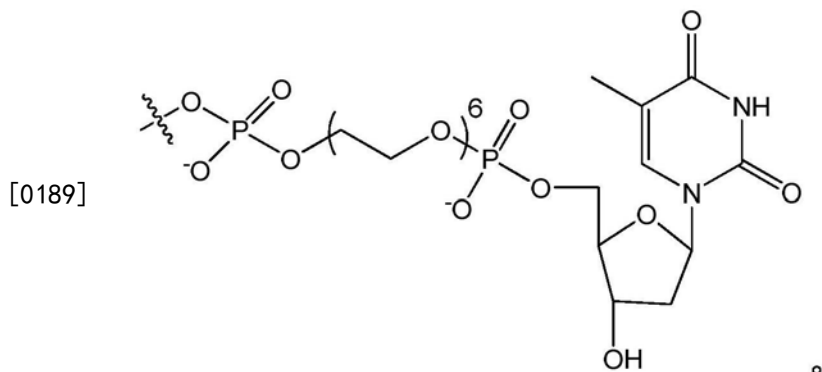
或

[0187]





[0188] 结构(I)的化合物的某些实施方案可以根据类似于本领域已知的用于制备寡核苷酸的固相合成方法制备。因此,在一些实施方案中,L'是与固体支持物,固体支持物残基或核苷的键。包含活化的脱氧胸苷(dT)基团的固体支持物是容易获得的,并且在一些实施方案中可以用作制备结构(I)的化合物的起始材料。因此,在一些实施方案中,R<sup>2</sup>或R<sup>3</sup>具有以下结构:



[0190] 本领域技术人员将理解,包括上述dT基团仅为了便于合成和经济效率,而不是必需的。可以使用其它固体支持物并且将导致L'上存在不同的核苷或固体支持物残基,或者可以在合成后除去或修饰核苷或固体支持物残基。

[0191] 在其它实施方案中,Q在每次出现时独立地为包含能够与分析物分子或固体支持物形成共价键的反应性基团的部分。在另外的实施方案中,Q在每次出现时独立地为包含能够与互补反应性基团Q'形成共价键的反应性基团的部分。例如,在一些实施方案中,Q'存在于结构(I)的其它化合物上(例如在R<sup>2</sup>或R<sup>3</sup>位置),和Q和Q'包含互补反应性基团,使得结构(I)的化合物与结构(I)的其它化合物的反应导致结构(I)的化合物的共价键合的二聚体。结构(I)的多聚体化合物也可以以类似的方式制备,并且包括在本发明的实施方案的范围内。

[0192] Q基团的类型和Q基团与结构(I)的化合物的其余部分的连接性不受限制,条件是Q包含具有形成所需键的适当反应性的部分。

[0193] 在某些实施方案中,Q是在水性条件下不易水解的部分,但具有足够的反应性以与分析物分子或固体支持物(例如胺,叠氮化物或炔烃)上的相应基团形成键。

[0194] 结构(I)的化合物的某些实施方案包括通常用于生物缀合领域的Q基团。例如在一些实施方案中,Q包含亲核反应性基团,亲电反应性基团或环加成反应性基团。在一些更具体的实施方案中,Q包含巯基,二硫化物,活化酯,异硫氰酸酯,叠氮化物,炔烃,烯烃,二烯,亲双烯体,酰卤,磺酰卤,膦, $\alpha$ -卤代酰胺,生物素,氨基或马来酰亚胺官能团。在一些实施方案中,活化酯为N-琥珀酰亚胺酯,亚氨酸酯或多氟苯基酯(polyfluorophenyl ester)。在另外的实施方案中,炔烃是一种烷基叠氮化物或酰基叠氮化物。

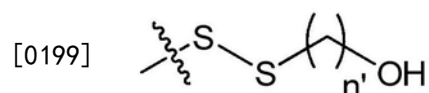
[0195] 可以以被保护形式方便地提供Q基团以增加储存稳定性或其它所需的性质,然后在适当的时间除去保护基团以与例如靶向部分或分析物缀合。因此,Q基团包括反应性基团的“被保护形式”,包括上文和下表1中描述的任何反应性基团。Q的“被保护形式”是指在预定反应条件下相对于Q具有较低反应性的部分,但其可以在优选不降解或与结构(I)的化合物的其它部分反应的条件下转化为Q。本领域技术人员可以基于特定的Q和期望的最终使用和存储条件导出适当的被保护形式的Q。例如,当Q是SH时,被保护的Q形式包括二硫化物,可

以使用通常已知的技术和试剂将二硫化物还原以显示SH部分。

[0196] 在另外的实施方案中, Q部分被方便地掩蔽(例如保护)为二硫化物部分, 其随后可被还原以提供活化的Q部分以结合所需的分析物分子或靶向部分。例如, Q部分可以被掩蔽为具有以下结构的二硫化物:




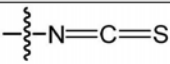
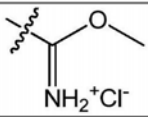
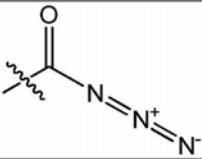
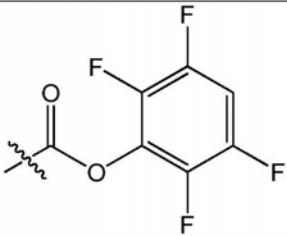
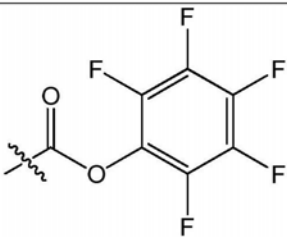
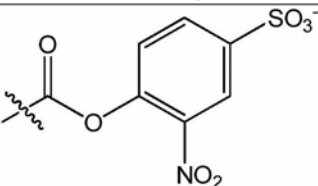
[0198] 其中R是任选地被取代的烷基。例如, 在一些实施方案中, 将Q提供为具有以下结构的二硫化物部分:

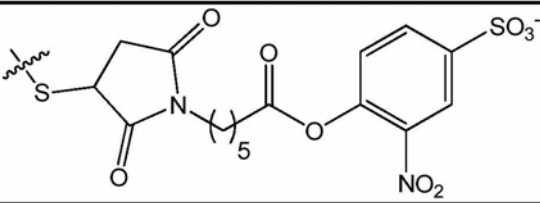
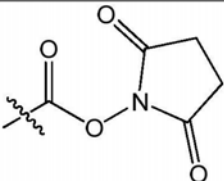
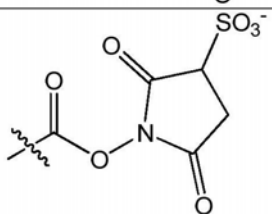
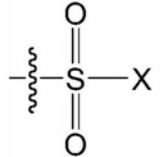
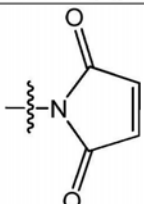
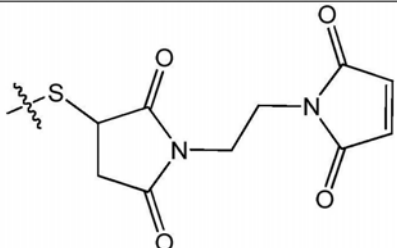
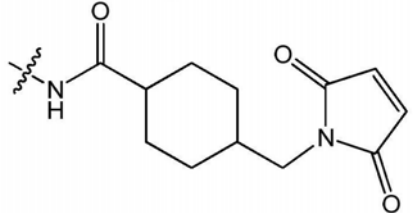
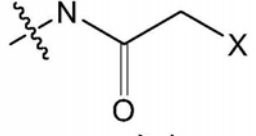


[0200] 其中n是1-10的整数, 例如6。

[0201] 示例性Q部分如下表I中所示。

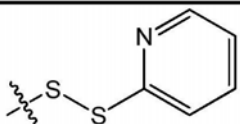
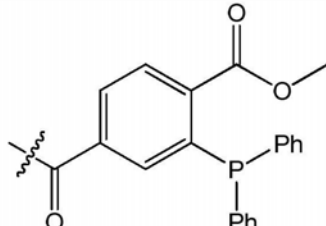

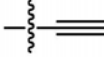
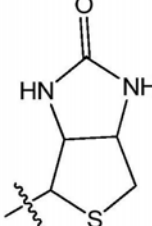
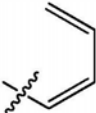
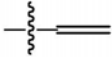
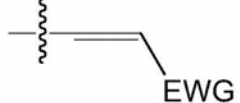
[0202] 表1. 示例性Q部分

结构	类别
	巯基
	异硫氰酸酯
	亚氨酸酯
	酰基叠氮化物
[0203] 	活化酯
	活化酯
	活化酯

结构	类别
	活化酯
	活化酯
	活化酯
 <p>X = 卤素</p>	磺酰卤
	马来酰亚胺
	马来酰亚胺
	马来酰亚胺
 <p>X = 卤素</p>	$\alpha$ -卤代酰亚胺

[0204]

[0205]

结构	类别
	二硫化物
	磷
	叠氮化物
	炔烃
	生物素
	二烯
	烯烃/亲双烯体
 EWG = 吸电子基团	烯烃/亲双烯体
$\text{-NH}_2$	氨基

[0206] 应当注意, 在一些实施方案中, 其中Q是SH, SH部分倾向于与另一种结构(I)的化合物上的另一个巯基形成二硫键。因此, 一些实施方案包括结构(I)的化合物, 其为二硫化物二聚体的形式, 二硫键衍生自SH Q基团。

[0207] 在一些其它实施方案中,  $R^2$ 或 $R^3$ 之一为OH或 $\text{-OP}(=\text{R}_a)(\text{R}_b)\text{R}_c$ ,  $R^2$ 或 $R^3$ 中的另一个为包含与分析物分子的共价键的连接基或包含与固体支持物的共价键的连接基。例如, 在一些实施方案中, 分析物分子是核酸、氨基酸或其聚合物。在另外的实施方案中, 分析物分子是酶, 受体, 受体配体, 抗体, 糖蛋白, 适配体或朊病毒。在更不同的实施方案中, 固体支持物是聚合物珠粒或非聚合物珠粒。

[0208]  $m^1$ 的值是另一个可以根据所需的荧光和/或颜色强度选择的变量。在一个实施方案中,  $m$ 在每次出现时独立地为1-10、3-10或7-9的整数。在另外的实施方案中,  $m$ 在每次出现时独立地为1-5的整数, 例如1、2、3、4或5。在另外的实施方案中,  $m$ 在每次出现时独立地为5-10的整数, 例如5、6、7、8、9或10。在另外的实施方案中, 每次出现的 $m$ 是1或更大的整数。例如, 在一些实施方案中,  $m$ 的每次出现是2或更大或3或更大的整数。

[0209] 在一些实施方案中, $m^2$ 在每次出现时为1。

[0210] 荧光强度还可以通过选择n的不同值来调整。在某些实施方案中,n是1-100的整数。在另外的实施方案中,n是1-10的整数。在一些实施方案中,n是1。

[0211] 基于所需的光学性质选择M,例如,基于所需的颜色和/或荧光发射波长。在一些实施方案中,在每次出现时,M是相同的;然而,重要的是要注意每次出现的M不必是相同的M,并且某些实施方案包括其中M在每次出现时不相同的化合物。例如,在一些实施方案中,每个M是不同的,并且选择不同的M部分以具有用于荧光共振能量转移(FRET)方法的吸光度和/或发射。例如,在这样的实施方案中,选择不同的M部分,使得一个波长的辐射吸收通过FRET机制引起不同波长的辐射发射。基于所需的最终用途,本领域普通技术人员可以适当地选择示例性的M部分。用于FRET方法的示例性M部分包括荧光素和5-TAMRA(5-羧基四甲基罗丹明,琥珀酰亚胺酯)染料。

[0212] M可以从M上的任何位置(即原子)连接到分子的其余部分。本领域技术人员将认识到将M连接到分子其余部分的方法。示例性方法包含本文所述的“点击”反应。

[0213] 在一些实施方案中,M是荧光或有色部分。可以使用任何荧光和/或有色部分,例如可以使用本领域已知的并且典型地用于比色、UV和/或荧光测定的那些。可以用于本发明不同实施方案中的M部分的实例包括、但不限于咕吨衍生物(例如荧光素,罗丹明,俄勒冈绿,曙红或德克萨斯红);花青衍生物(例如花青,吲哚碳菁,oxacarboxyanine,thiacarboxyanine或部花青);方酸类化合物衍生物和环取代的方酸类化合物,包括Seta,SeTau和Square染料;萘衍生物(例如丹酰(dansyl)和氟硅酸钠(prodan)衍生物);香豆素衍生物;噻二唑衍生物(例如吡啶基噻唑,硝基苯并噻二唑或苯并噻二唑);蒽衍生物(例如蒽醌,包括DRAQ5,DRAQ7和CyTRAK橙);苝衍生物,如瀑布蓝;噻嗪衍生物(例如尼罗红,尼罗蓝,甲酚紫,噻嗪170);吡啶衍生物(例如原黄素,吡啶橙,吡啶黄);芳基次甲基衍生物:金胺,结晶紫,孔雀石绿;和四吡咯衍生物(例如卟吩,酞菁或胆红素)。其它示例性M部分包括:花青染料,黄原酸盐染料(例如Hex,Vic,Nedd,Joe或Tet);Yakima黄;Redmond红;tamra;德克萨斯红和**alexafuor®**染料。

[0214] 在任何前述的其它实施方案中,M包含三个或更多个芳基或杂芳基环或其组合,例如四个或更多个芳基或杂芳基环或其组合,或甚至五个或更多个芳基或杂芳基环或其组合。在一些实施方案中,M包含六个芳基或杂芳基环或其组合。在进一步的实施方案中,环是稠合的。例如,在一些实施方案中,M包括三个或更多个稠合环,四个或更多个稠合环,五个或更多个稠合环,或甚至六个或更多个稠合环。

[0215] 在一些实施方案中,M是环状的。例如,在一些实施方案中,M是碳环。在另外的实施方案中,M是杂环。在上述另外的实施方案中,M在每次出现时独立地包含芳基部分。在这些实施方案中的一些中,芳基部分是多环的。在另外的更具体的实例中,芳基部分是稠合多环芳基部分,例如其可以包含至少3个、至少4个乃至多于4个的芳基环。

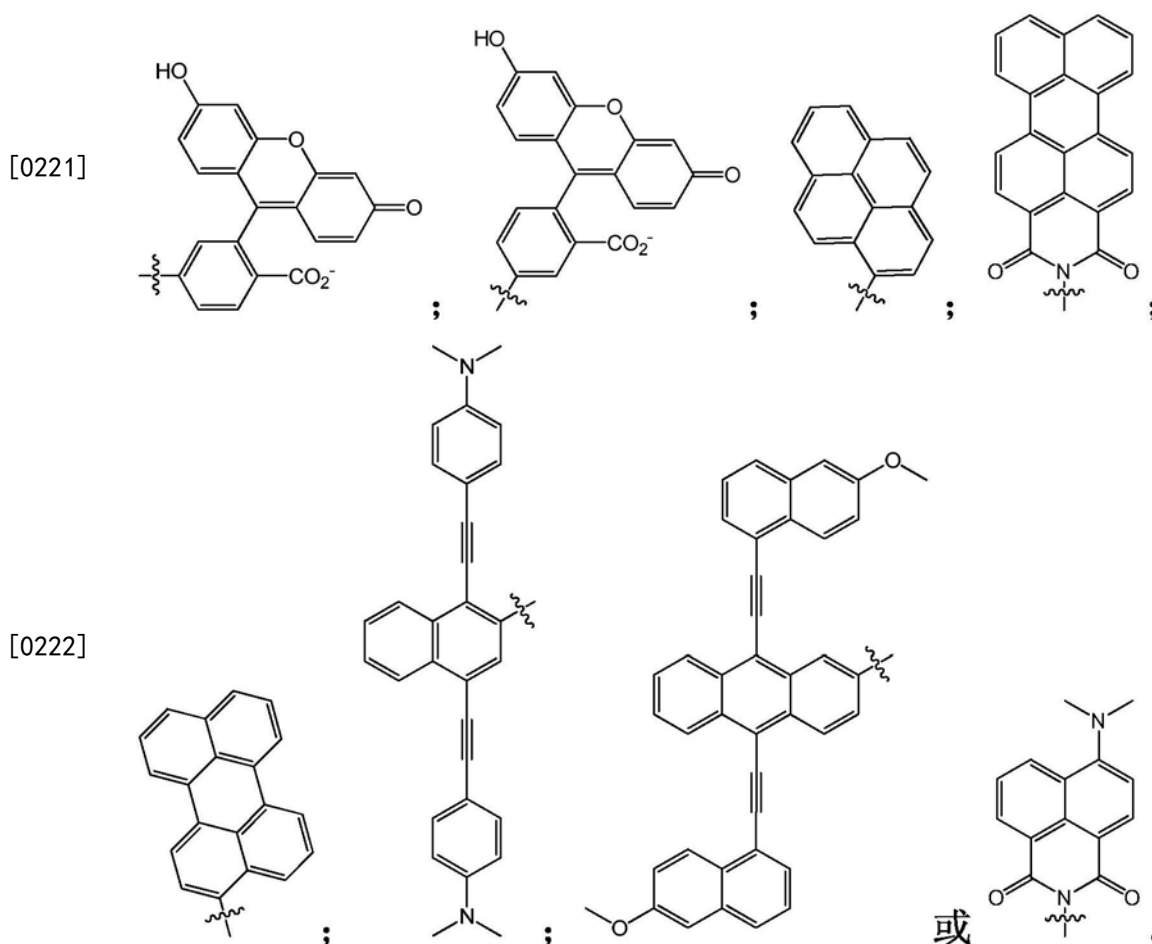
[0216] 在任意上述结构(I)的化合物的另外的实施方案中,M在每次出现时独立地包含至少1个杂原子。例如,在一些实施方案中,杂原子是氮、氧或硫。

[0217] 在任何前述的更多的实施方案中,M在每次出现时独立地包含至少一个取代基。在一些实施方案中,取代基是氟,氯,溴,碘,氨基,烷基氨基,芳基氨基,羟基,巯基,烷氧基,芳基氧基,苯基,芳基,甲基,乙基,丙基,丁基,异丙基,叔丁基,羧基,磺酸酯,酰胺或甲酰基。

[0218] 在上述一些甚至更具体的实施方案中,M在每次出现时独立地为二甲基氨基苝,喹吖啶酮,氟苯基-二甲基-BODIPY,his-氟苯基-BODIPY,吖啶,三萘嵌二苯,联六苯,卟啉,苯并苝,(氟苯基-二甲基-二氟硼杂-二氮杂-引达省)苯基,(双-氟苯基-二氟硼杂-二氮杂-并二苯)苯基,四联苯,联苯并噻唑,三联苯并噻唑,联萘,联蒽,方酸类化合物,squarylium,9,10-乙炔基蒽或三联萘部分。在另外的实施方案中,M在每次出现时独立地为对三联苯,花,偶氮苯,吩嗪,菲咯啉,吖啶,噻吨,苝,红荧烯,蒽,花青,花酰亚胺,或花酰胺或其衍生物。在仍然更多的实施方案中,M在每次出现时独立地为香豆素染料,试卤灵染料,二吡咯亚甲基硼二氟化物染料,钌联吡啶染料,能量转移染料,噻唑橙染料,聚甲炔或N-芳基-1,8-萘二甲酰亚胺染料。

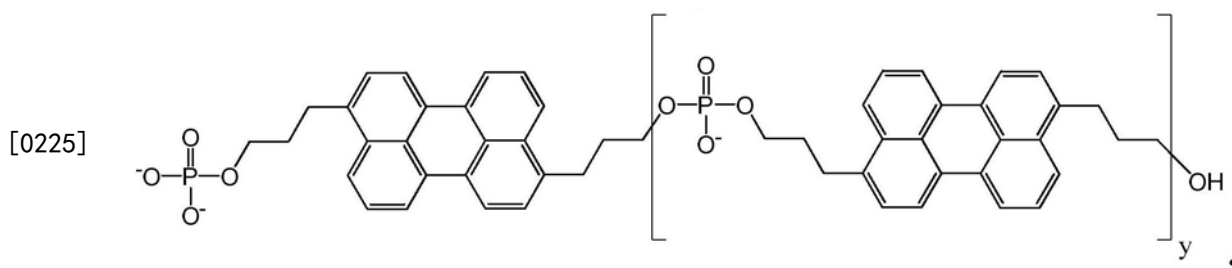
[0219] 在任意上述的更多的实施方案中,M在每次出现时是相同的。在另外的实施方案中,M各自是不同的。在仍然更多的实施方案中,一个或多个M相同,且一个或多个M不同。

[0220] 在一些实施方案中,M是苝、花、花一酰亚胺或6-FAM或其衍生物。在某些另外的实施方案中,M具有以下结构之一:



[0223] 尽管包含羧酸基团的M部分以阴离子形式( $\text{CO}_2^-$ )描绘,但本领域技术人员将理解,这将根据pH而变化,并且质子化形式( $\text{CO}_2\text{H}$ )包括在各种实施方案中。

[0224] 在一些具体实施方案中,结构(I)的化合物具有以下结构:



[0226] 其中 $y$ 是大于1的整数,例如1-10的整数。

[0227] 本公开的染料化合物是“可调的”,意指通过适当选择任何前述化合物中的变量,本领域技术人员可以得到具有所需和/或预定摩尔荧光(摩尔亮度)的化合物。化合物的可调性允许使用者容易地获得具有所需荧光和/或颜色的化合物,以用于特定测定或用于鉴定感兴趣的特定分析物。尽管所有变量都可能对化合物的摩尔荧光有影响,但认为 $M$ 、 $M'$ 、 $m^1$ 、 $m^2$ 、 $n$ 、 $x$ 、 $y$ 和 $z$ 的适当选择在化合物的摩尔荧光中起重要作用。因此,在一个实施方案中,提供了获得具有所需摩尔荧光的化合物的方法,所述方法包含选择具有已知荧光的 $M$ 和/或 $M'$ 部分,制备包含 $M$ 和/或 $M'$ 部分的结构(I)的化合物,并选择 $m^1$ 、 $m^2$ 、 $n$ 、 $x$ 、 $y$ 和 $z$ 的适当变量以得到所需的摩尔荧光。

[0228] 在某些实施方案中,摩尔荧光可以相对于亲本荧光团(例如单体)的荧光发射的倍数增加或减少来表示。在一些实施方案中,本发明化合物的摩尔荧光相对于亲本荧光团为 $1.1x$ 、 $1.5x$ 、 $2x$ 、 $3x$ 、 $4x$ 、 $5x$ 、 $6x$ 、 $7x$ 、 $8x$ 、 $9x$ 、 $10x$ 或甚至更高。各种实施方案包括通过适当选择 $m$ 和 $n$ 制备相对于亲本荧光团具有所需荧光倍数增加的化合物。

[0229] 为了便于说明,包含磷酸部分的各种化合物(例如磷酸酯等)以阴离子状态描述(例如 $-OP(=O)(OH)O^-$ 、 $-OP(=O)_3^{2-}$ )。本领域技术人员将容易理解,电荷取决于pH和不带电荷(例如质子化或盐,例如钠或其它阳离子)形式也包括在本发明实施方案的范围内。

[0230] 在一些实施方案中,任何前述结构(I)的化合物包括在进一步包含一种或多种环糊精的组合物中。不希望受理论束缚,据信环糊精有助于防止或减少染料部分(例如荧光和/或有色部分)的分子内猝灭,从而产生具有高摩尔“亮度”的染料化合物(例如高荧光发射)。

[0231] 任何环糊精可以在各种实施方案的实践中使用,条件是环糊精减少或防止染料部分的分子内猝灭。通常选择对结构(I)的特定化合物具有亲和力的环糊精。在一些实施方案中,环糊精是 $\alpha$ -环糊精, $\beta$ -环糊精或 $\gamma$ -环糊精。在一些实施方案中,环糊精是 $\beta$ -环糊精。在一些实施方案中,这类组合物包含水。

[0232] 在各种其它实施方案中提供了包含任何前述化合物和一种或多种分析物分子(例如生物分子)的组合物。在一些实施方案中,还提供了这种组合物在分析方法中用于检测一种或多种分析物分子的用途。

[0233] 在其它实施方案中,化合物可用于各种分析方法。例如,在某些实施方案中,本公开内容提供了染色样品的方法,所述方法包含向所述样品添加结构(I)的化合物,其中 $R^2$ 或 $R^3$ 之一为包含与分析物分子(例如,生物分子)或微粒的共价键的连接基,且 $R^2$ 或 $R^3$ 中的另一个为H、OH、烷基、烷氧基、烷基醚或 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ ,其量足以在所述样品在适当的波长被照射时产生光学响应。

[0234] 在前述方法的一些实施方案中, $R^2$ 是包含与分析物分子(例如生物分子)的共价键

的连接基。例如,核酸,氨基酸或其聚合物(例如多核苷酸或多肽)。在仍然更多的实施方案中,生物分子是酶,受体,受体配体,抗体,糖蛋白,适配体或朊病毒。

[0235] 在前述方法的其它实施方案中, $R^2$ 为包含与固体支持物(例如微粒)的共价键的连接基。例如,在一些实施方案中,微粒是聚合物珠粒或非聚合物珠粒。

[0236] 在甚至更多的实施方案中,所述光学响应是荧光响应。

[0237] 在另外的实施方案中,所述样品包含细胞,且一些实施方案还包含通过流式细胞术观察所述细胞。

[0238] 在仍然更多的实施方案中,该方法还包含将所述荧光响应与具有可检测出不同的光学性质的第二荧光团的荧光响应区分开。

[0239] 在另外的实施方案中,本公开提供了用于视觉检测分析物分子例如生物分子的方法,该方法包含:

[0240] (a) 提供结构(I)的化合物,例如其中 $R^2$ 或 $R^3$ 之一为包含与分析物分子的共价键的连接基,而 $R^2$ 或 $R^3$ 的另一个为H、OH、烷基、烷氧基、烷基醚或 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ ;和

[0241] (b) 通过所述化合物的可视性质检测所述化合物。

[0242] 在一些实施方案中,所述分析物分子是核酸、氨基酸或其聚合物(例如多核苷酸或多肽)。在仍然更多的实施方案中,所述分析物分子是酶、受体、受体配体、抗体、糖蛋白、适配体或朊病毒。

[0243] 在另外的实施方案中,提供了用于视觉检测分析物分子的方法,例如生物分子,该方法包含:

[0244] (a) 混合任意上述化合物与一种或多种分析物分子;和

[0245] (b) 通过所述化合物的可视性质检测所述化合物。

[0246] 在另外的实施方案中,提供了用于视觉检测分析物分子的方法,所述方法包含:

[0247] (a) 混合权利要求1的化合物与分析物分子,其中 $R^2$ 或 $R^3$ 为Q或为包含与Q的共价键的连接基;

[0248] (b) 形成所述化合物和所述分析物分子的缀合物;和

[0249] (c) 通过所述缀合物的可视性质检测所述缀合物。

[0250] 另外的示例性方法包含用于检测分析物的方法,所述方法包含:

[0251] (a) 提供结构(I)的化合物,其中 $R^2$ 或 $R^3$ 包含连接基,所述连接基包含与靶向部分的共价键,所述靶向部分对分析物具有特异性;

[0252] (b) 混合化合物和分析物,由此使靶向部分与分析物缔合;和

[0253] (c) 例如通过所述化合物的可视或荧光性质检测所述化合物。

[0254] 在前述方法的某些实施方案中,分析物是颗粒,例如细胞,并且该方法包含使用流式细胞术。例如,该化合物可以具有靶向部分,例如抗体,用于选择性地与所需细胞缔合,从而使细胞可通过许多技术检测,例如可见或荧光检测。本领域普通技术人员可根据所需的最终用途选择合适的抗体。用于某些实施方案的示例性抗体包括UCHT1和MOPC-21。

[0255] 因此,本发明化合物的实施方案可用于许多方法,包括但不限于:细胞计数;细胞分选;生物标记物检测;定量细胞凋亡;确定细胞活力;鉴定细胞表面抗原;测定总DNA和/或RNA含量;鉴定特定的核酸序列(例如作为核酸探针);和诊断疾病,例如血癌。

[0256] 在一些其它不同的实施方案中,结构(I)的化合物可以用于各种细胞分析。例如,



通过使用流式细胞术,这些化合物可用于区分活细胞和死细胞,评估细胞的健康状况(例如坏死与早期凋亡与晚期凋亡与活细胞的比较),在细胞循环内追踪倍性和有丝分裂并确定细胞增殖的各种状态。尽管不希望受理论束缚,但据信结构(I)的化合物的实施方案优先结合或以其它方式与带正电荷的部分缔合。因此,在一些实施方案中,所述化合物可用于确定非完整细胞例如坏死细胞的存在的方法中。例如,可以通过将含有细胞的样品与结构(I)的化合物混合并通过流式细胞术分析混合物来确定坏死细胞的存在。结构(I)的化合物与坏死细胞结合或缔合,且由此它们的存在在流式细胞术条件下是可检测的。与需要胺反应性基团(或其它反应性基团)结合坏死细胞的其它染色试剂相反,使用结构(I)的化合物的染色方法的实施方案不需要无蛋白质的温育缓冲液,因此与相关的已知方法相比,方法的执行效率更高。

[0257] 因此,在一些实施方案中,本发明提供了用于确定样品中死细胞的存在的方法,所述方法包含使所述样品与结构(I)的化合物接触,从而使所述化合物与死细胞结合或缔合,并观察来自于与死细胞结合或缔合的化合物的荧光信号。例如,一些实施方案包括使用流式细胞术来观察与死细胞结合或缔合的化合物。如上所述,某些方法不需要使用反应性基团来与死细胞结合或缔合。因此,在某些实施方案中,用于鉴定死细胞的结构(I)的化合物是其中 $R^2$ 和 $R^3$ 各自独立地为OH或-OP(=R<sub>a</sub>)(R<sub>b</sub>)R<sub>c</sub>的结构(I)的化合物。

[0258] 在各种其它实施方案中,所述化合物可用于相关方法中,以确定完整或非完整细胞,凋亡小体,去极化膜和/或渗透膜中带正电荷的部分的存在。

[0259] 除了上述方法之外,结构(I)的化合物的实施方案可用于各种学科和方法,包括但不限于:用于鉴定癌症和其它组织的内窥镜检查程序中的成像;单细胞和/或单分子分析方法,例如检测具有很少或没有扩增的多核苷酸;癌症成像,例如通过在结构(I)的化合物中包括靶向部分例如抗体或糖或其它优先结合癌细胞的部分;外科手术中的成像;组蛋白的结合,用于鉴定各种疾病;药物递送,例如通过用活性药物部分替代结构(I)的化合物中的M部分;和/或牙科工作和其它程序中的造影剂,例如通过结构(I)的化合物与各种菌群和/或生物体的优先结合。

[0260] 应理解,如上所述的结构(I)的化合物的任何实施方案和本文对于如上所述的结构(I)的化合物中 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、L、L'、L<sup>1</sup>、L<sup>2</sup>、L<sup>3</sup>、L<sup>4</sup>、M、M'、m<sup>1</sup>、m<sup>2</sup>、n、x、y和/或z变量的任何特定选择可以独立地与结构(I)的化合物的其它实施方案和/或变量组合,形成上面没有具体阐述的本发明的实施方案。此外,如果列出的选项列表是针对任何特定的 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、L、L<sup>1</sup>、L<sup>2</sup>、L<sup>3</sup>、L<sup>4</sup>、M、M'、m<sup>1</sup>、m<sup>2</sup>、n、x、y和/或z在特定实施方案和/或权利要求中,应理解,可以从特定实施例和/或权利要求中删除每个单独的选择,并且剩余的选择列表将被认为是在本发明的范围内。

[0261] 应理解,在本说明书中,所描述的式子的取代基和/或变量的组合仅在这种贡献产生稳定化合物时才是允许的。

[0262] 本领域技术人员还应理解,在本文所述的方法中,中间体化合物的官能团可能需要通过合适的保护基团保护。这些官能团包括羟基,氨基,巯基和羧酸。合适的羟基保护基包括三烷基甲硅烷基或二芳基烷基甲硅烷基(例如,叔丁基二甲基甲硅烷基,叔丁基二苯基甲硅烷基或三甲基甲硅烷基),四氢吡喃基,苄基等。适用于氨基,脒基和胍基的保护基包括叔丁氧基羰基,苄氧基羰基等。合适的巯基保护基包括-C(O)-R''(其中R''是烷基,芳基或芳

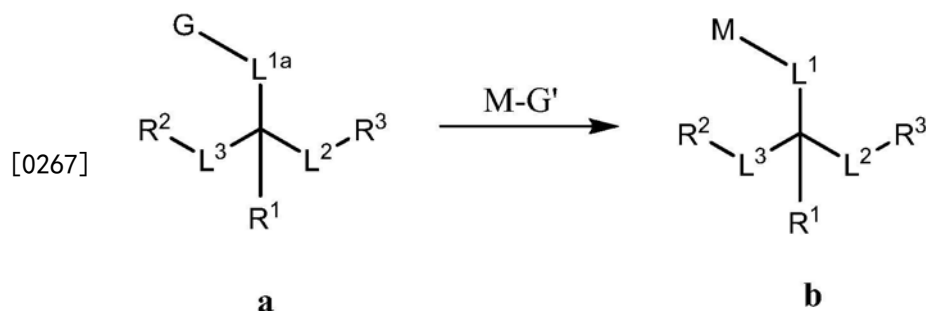
基烷基),对甲氧基苄基,三苯甲基等。适合的羧酸保护基包括烷基,芳基或芳基烷基酯。可以根据标准技术添加或去除保护基团,这些技术是本领域技术人员已知的并且如本文所述。Green, T.W. 和 P.G.M. Wutz, *Protective Groups in Organic Synthesis* (1999), 3rd Ed., Wiley 中详细描述了保护基团的使用。如本领域技术人员所理解的,保护基团也可以是聚合物树脂,例如 Wang 树脂, Rink 树脂或 2-氯三苯甲基氯树脂。

[0263] 此外,通过本领域技术人员已知的方法用适当的无机或有机碱或酸处理,可以将以游离碱或酸形式存在的所有本发明化合物转化为其盐。可通过标准技术将本发明化合物的盐转化为其游离碱或酸形式。

[0264] 以下反应方案说明了制备本发明化合物的示例性方法。应理解,本领域技术人员可能能够通过类似方法或通过组合本领域技术人员已知的其它方法制备这些化合物。还应理解,本领域技术人员将能够以下述类似方式通过使用适当的起始组分和根据需要修改合成参数来制备下面未具体说明的结构 (I) 的其它化合物。通常,起始成分可以从诸如 Sigma Aldrich, Lancaster Synthesis, Inc., Maybridge, Matrix Scientific, TCI 和 Fluorochem USA 等来源获得,或者根据本领域技术人员已知的来源合成(参见,例如, *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*, 第5版 (Wiley, 2000年12月)) 或如本发明所述制备。

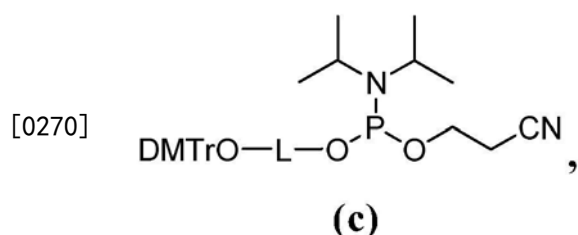
[0265] 结构 (I) 的化合物的实施方案根据实施例中所所述的一般方法制备。用于制备用于制备结构 (I) 的化合物的中间体的方法如下所述。

[0266] 反应方案 I



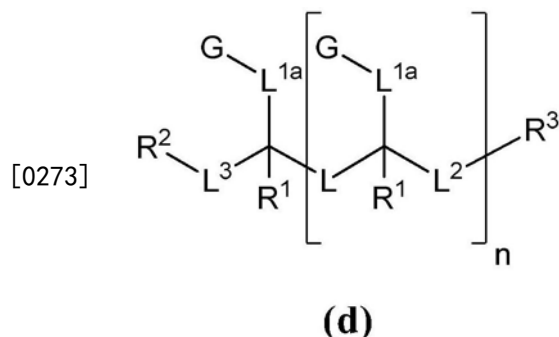
[0268] 反应方案 I 示例了制备用于制备结构 (I) 的化合物的中间体的示例性方法。参考反应方案 I, 其中  $\text{R}^1$ 、 $\text{L}^1$ 、 $\text{L}^2$ 、 $\text{L}^3$ 、 $\text{G}$  和  $\text{M}$  如上所定义, 且  $\text{R}^2$  和  $\text{R}^3$  如上所定义或是其被保护的变体, 结构 a 的化合物, 其可以购买或通过众所周知的技术制备, 与  $\text{M-G}'$  反应得到结构 b 的化合物。这里,  $\text{G}$  和  $\text{G}'$  代表具有互补反应性的官能团 (即, 反应形成共价键的官能团)。 $\text{G}'$  可以是  $\text{M}$  的侧链或  $\text{M}$  的结构骨架的一部分。 $\text{G}$  和  $\text{G}'$  可以是本文所述的任何数目的官能团, 例如分别为炔烃和叠氮化物, 分别为胺和活化酯, 或分别为胺和异硫氰酸酯等。

[0269] 用于制备结构 (I) 的化合物的中间体可以通过在公知的自动 DNA 合成条件下与具有以下结构 (c) 的亚磷酰胺化合物反应从结构 b 制备:



[0271] 其中L独立地为任意的连接基,然后与另一种结构b的化合物反应。通过在DNA合成条件下使所需数目的结构b化合物顺序地与适当的亚磷酰胺试剂反应来制备多聚体化合物。

[0272] 或者,通过首先在典型的DNA合成条件下合成具有以下结构d的二聚体或寡聚化合物来制备化合物:



[0274] 然后使结构d的化合物与M-L<sup>1b</sup>-G'反应,其中G在每次出现时独立地为包含能够与互补反应性基团G'形成共价键的反应性基团的部分;L<sup>1a</sup>和L<sup>1b</sup>在每次出现时独立地为任意的亚烷基,亚烯基,亚炔基,亚杂烷基,亚杂烯基,亚杂炔基或杂原子连接基;且M、L<sup>2</sup>、L<sup>3</sup>、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>和n如本文对结构(I)的化合物所定义。然后根据本领域已知的方法加入结构(I)的化合物的剩余部分。

[0275] DNA合成方法在本领域中是众所周知的。简言之,将上述中间体b或d中的两个醇基团例如R<sup>2</sup>和R<sup>3</sup>分别用二甲氧基三苯甲基(DMT)基团和2-氰基乙基-N,N-二异丙基氨基亚磷酰胺基官能化。亚磷酰胺基团通常在存在活化剂如四唑的情况下与醇基偶联,然后用碘氧化亚磷原子。二甲氧基三苯甲基可以用酸(例如氯乙酸)除去以暴露游离醇,其可以与亚磷酰胺基反应。在通过用氨水处理进行低聚反应后可以除去2-氰基乙基。

[0276] 用于寡聚化方法的亚磷酰胺的制备也是本领域熟知的。例如,伯醇(例如R<sup>3</sup>)可以通过与DMT-C1的反应被保护为DMT基团。然后通过适当的试剂如2-氰基乙基N,N-二异丙基氯亚磷酰胺反应,将仲醇(例如R<sup>2</sup>)官能化为亚磷酰胺。制备亚磷酰胺及其低聚反应的方法是本领域熟知的,并在实施例中更详细地描述。

[0277] 提供以下实施例用于说明目的而非限制。

## 实施例

### [0278] 一般方法

[0279] 在JEOL 400MHz光谱仪上获得<sup>1</sup>H NMR谱。<sup>1</sup>H光谱参比TMS。使用具有保持在45℃的2.1mm x 50mm Acquity BEH-C18柱的Waters Acquity UHPLC系统进行反相HPLC染料分析。使用MassLynx 4.1采集软件,在Waters/Micromass Quattro micro MS/MS(仅以MS模式)系统上进行质谱分析。用于对染料的LC/MS的流动相是100mM 1,1,1,3,3,3-六氟-2-丙醇(HFIP),8.6mM三乙胺(TEA),pH 8。使用具有保持在45℃的2.1mm x 50mm Acquity BEH-C18柱的Waters Acquity UHPLC系统分析亚磷酰胺和前体分子,其中使用乙腈/水流动相梯度。在Waters/Micromass Quattro micro MS/MS系统(仅以MS模式)上使用**草鎗**(tropylium)阳离子输注增强电离获得单体中间体的分子量。<sup>1</sup>使用Cary Eclipse光谱光度计记录激发和

发射特性实验。

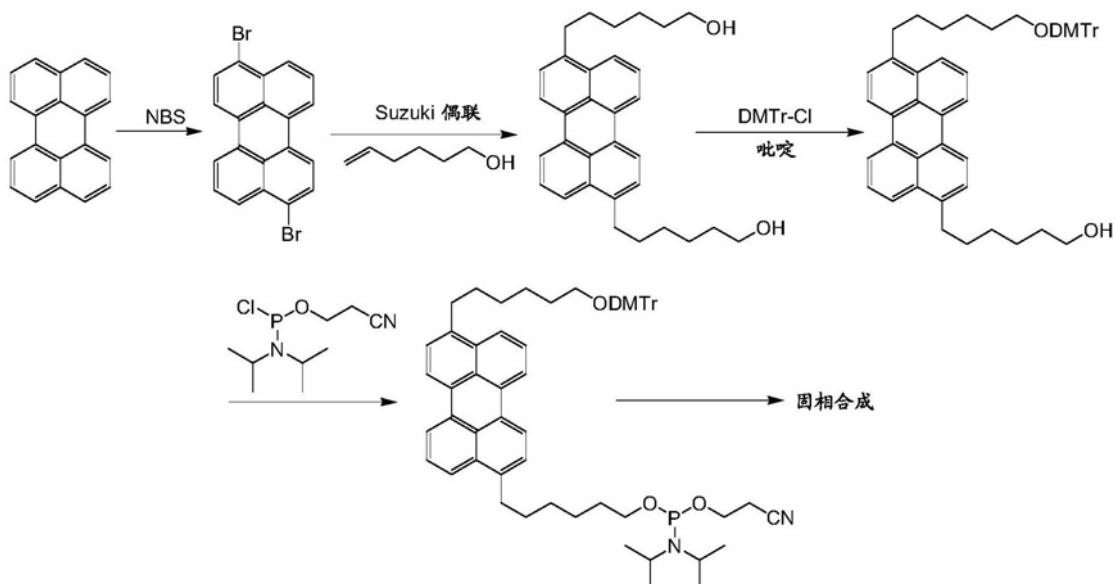
[0280] 除非另外声明,否则全部反应均在烘箱干燥的玻璃器具中在氮气气氛下实施。市售DNA合成试剂购自Glen Research (Sterling,VA)。无水吡啶、甲苯、二氯甲烷、二异丙基胺、三乙胺、乙酸、吡啶和THF购自Aldrich。所有其它化学品均购自Aldrich或TCI并且原样使用,不作额外纯化。

[0281] 使用基于亚磷酰胺的偶联方法的标准方案,ABI 394 DNA合成仪上合成结构(I)的化合物。用于合成寡核苷酸氨基磷酸酯的链装配循环如下:(i) 去三苯甲基化,二氯甲烷中的3%三氯乙酸,1分钟;(ii) 偶联,乙腈中的0.1M亚磷酰胺和0.45M四唑,10分钟;(iii) 封端,THF/卢剔啶(1/1,v/v)中的0.5M乙酸酐,15秒;(iv) 氧化,THF/吡啶/水(10/10/1,v/v/v)中的0.1M碘,30秒。

[0282] 循环内部的化学步骤之后是乙腈洗涤和干燥氩气冲洗0.2-0.4分钟。通过用氨在室温1小时处理实现从支持物切下和移除碱基和氨基磷酸酯保护基。随后如上文所述通过反相HPLC分析寡核苷酸染料。

[0283] 实施例1

[0284] 二价芘亚磷酰胺的制备



[0286] 二溴-芘的制备.在具有搅拌棒的500mL圆底烧瓶中,将芘(2000mg,7.94mmol)溶于THF(320mL)中。向其中一次性加入N-溴代琥珀酰亚胺(4240mg,23.8mmol),将混合物搅拌过夜。在搅拌下将混合物缓慢倒入水(1500mL)中。搅拌30分钟后,通过过滤收集固体并在真空下干燥,得到二溴芘(2400mg,91%)。

[0287] 芘-C6-二醇的制备.将带有搅拌棒的烘箱干燥的250mL圆底烧瓶在氮气下冷却。向烧瓶中加入5-己烯-1-醇(378μL,3.2mmol)和THF(48mL)并置于氮气下。向其中加入9-BBN的THF溶液(16mL,8.0mmol,0.5M),并将反应容器配备回流冷凝器并加热至回流过夜。18小时后,将反应冷却至室温,加入脱气的磷酸钾溶液(0.94mL,4.0mmol,4.2M)。加入二溴芘(330mg,0.8mmol),通过长针头直接将氮气鼓泡通过混合物,使混合物脱气15分钟。除去针头,一次性加入[1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁]二氯化钡(II)(59mg,0.08mmol)。将反应容器重新配备回流冷凝器,置于氮气下并回流过夜。将混合物冷却至室温,用二氯甲烷

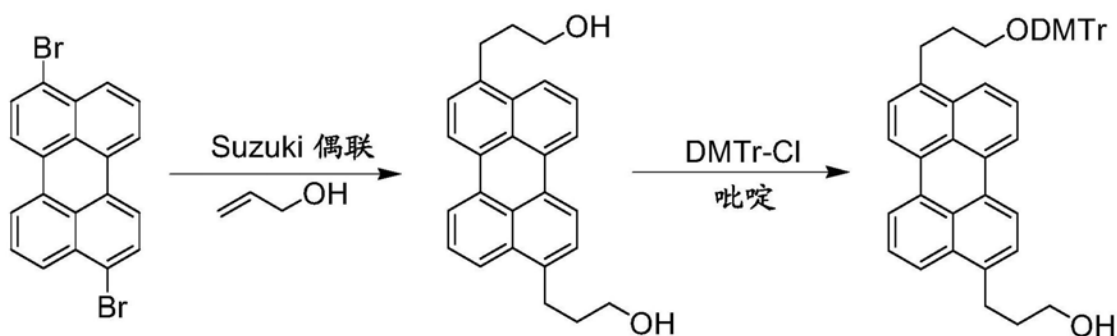
(100mL) 稀释,通过硅藻土过滤并浓缩。使用己烷/乙酸乙酯梯度,通过硅胶色谱法纯化油状残余物,得到所需的二醇,为油状物(129mg,30%)。

[0288] 芘C6-DMT-OH的制备.在带有搅拌棒的20mL圆底烧瓶中加入芘二醇(125mg,0.34mmol)和吡啶(2mL),搅拌混合物直至完全溶解。将烧瓶置于冰上15分钟,加入4,4'-二甲氧基三苯甲基氯(110mg,0.3mmol),将混合物在4℃搅拌过夜。加入甲醇(1mL)以淬灭反应并在4℃下搅拌10分钟。将混合物在旋转蒸发仪上浓缩(浴温<45℃)。将残余物重新溶解在乙酸乙酯中并用饱和碳酸氢钠溶液处理。通过分液漏斗分层,保留有机层。水层用乙酸乙酯萃取两次,合并有机层,用盐水洗涤,用硫酸钠干燥。过滤有机层并在旋转蒸发仪上浓缩。使用甲苯/甲醇梯度,通过硅胶色谱法进一步纯化粗产物,得到所需的被保护的醇,为油状物(118mg,52%)。

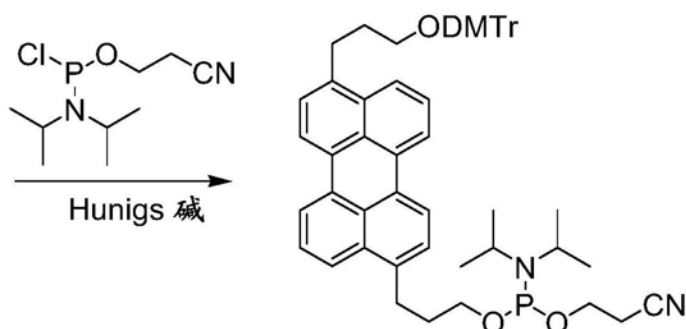
[0289] 芘-DMT-OH的亚磷酰胺化(Phosphitylation).在带有搅拌棒的50mL圆底烧瓶中,将芘DMT-OH(70mg,0.10mmol)置于干燥二氯甲烷(4.2mL)中。搅拌混合物直至醇完全分散。加入2-氰基乙基-N,N-二异丙基氯亚磷酰胺(46.4,0.2mmol)和二异丙基乙胺(90.7μL,0.5mmol),搅拌反应2小时。将混合物用二氯甲烷(25mL)稀释,然后倒入饱和碳酸氢钠溶液中。将这些层在萃取漏斗中分配并保留有机层。将有机层用硫酸钠干燥,过滤并浓缩成油状物,并直接用于固相合成(101mg,86%)。

[0290] 实施例2

[0291] 二价芘亚磷酰胺的可选制备



[0292]



[0293] 芘-C3-二醇的制备.将带有搅拌棒的烘箱干燥的500mL圆底烧瓶在氮气下冷却。向烧瓶中加入5-己烯-1-醇(2662μL,39mmol)和THF(215mL)并置于氮气下。向其中加入9-BBN的THF溶液(176mL,8.0mmol,0.5M),并将反应容器配备回流冷凝器并加热至回流过夜。18小时后,将反应冷却至室温,加入脱气的磷酸钾溶液(mL,24.4mmol,4.2M)。加入二溴芘(2000mg,4.9mmol),通过长针头直接将氮气鼓泡通过混合物,使混合物脱气15分钟。除去针

头,一次性加入[1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁]二氯化钨(II) (357mg,0.5mmol)。将反应容器重新配备回流冷凝器,置于氮气下并回流过夜。将混合物冷却至室温,用二氯甲烷(250mL)稀释,通过硅藻土过滤并浓缩。使用己烷/乙酸乙酯梯度,通过硅胶色谱法纯化油状残余物,得到所需的二醇,为油状物(912mg,41%)。

[0294] 茱C3-DMT-OH的制备.在带有搅拌棒的50mL圆底烧瓶中加入茱二醇(1000mg, 2.71mmol)和吡啶(14mL),搅拌混合物直至完全溶解。将烧瓶置于冰上15分钟,加入4,4'-二甲氧基三苯甲基氯(890mg,2.0mmol),将混合物在4℃搅拌过夜。加入甲醇(5mL)以淬灭反应,并在4℃下搅拌10分钟。将混合物在旋转蒸发仪上浓缩(浴温<45℃)。将残余物重新溶解在乙酸乙酯中并用饱和碳酸氢钠溶液处理。通过分液漏斗分层,保留有机层。水层用乙酸乙酯萃取两次,合并有机层,用盐水洗涤,用硫酸钠干燥。过滤有机层并在旋转蒸发仪上浓缩。使用甲苯/甲醇梯度,通过硅胶色谱法进一步纯化粗产物,得到所需的被保护的醇,为油状物(624mg,34%)。

[0295] 茱-DMT-OH的亚磷酰胺化(Phosphitylation).在带有搅拌棒的100mL圆底烧瓶中,将茱DMT-OH(623mg,0.93mmol)置于干燥二氯甲烷(37mL)中。搅拌混合物直至醇完全溶解。加入2-氰基乙基-N,N-二异丙基氯亚磷酰胺(413μL,1.9mmol)和二异丙基乙胺(807μL, 4.6mmol),将反应物搅拌2小时。然后将反应混合物用二氯甲烷(100mL)稀释,然后倒入饱和碳酸氢钠溶液中。将这些层在萃取漏斗中分配并保留有机层。将有机层用硫酸钠干燥,过滤并浓缩成油状物。用硅胶色谱法完成另外的纯化,得到所需产物,为油状物(401mg,49%)。

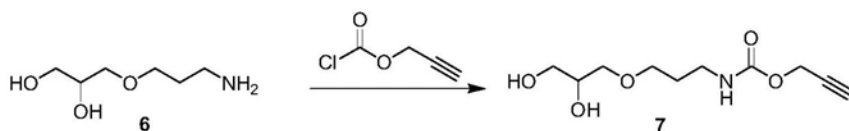
[0296] 实施例3

[0297] 结构(I)的化合物的合成

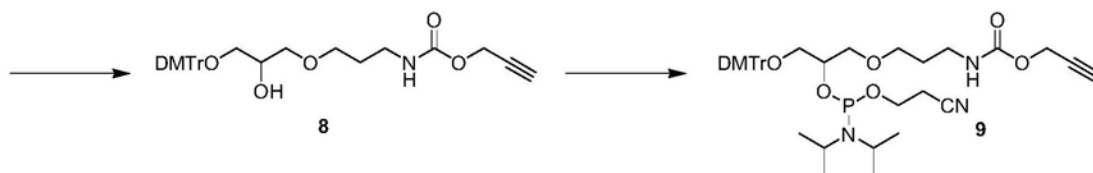
[0298] 化合物在Applied Biosystems 394 DNA/RNA合成仪上或在GE **AKTÄ** 10 OligoPilot上以1μmol或10μmol规模合成,并具有3'-磷酸酯基团。染料直接在CPG珠粒上或在聚苯乙烯固体载体上合成。通过标准固相DNA方法以3'至5'方向合成染料。偶联方法采用标准的β-氰乙基亚磷酰胺化学条件。将所有亚磷酰胺单体溶解在乙腈/二氯甲烷(0.1M溶液)中,并使用以下合成循环以连续顺序加入:1)使用在甲苯中的二氯乙酸除去5'-二甲氧基三苯甲基保护基团,2)使用在乙腈中的活化剂偶联下一个亚磷酰胺,3)使用碘/吡啶/水氧化,和4)使用乙酸酐/1-甲基咪唑/乙腈加帽。将茱亚磷酰胺(100mg)溶于干燥乙腈(700μL)和二氯甲烷(300μL)中。将少量筛子加入烧瓶中并用氩气覆盖。如上所述使用测序仪。重复合成循环直至组装5'寡氟化物(Oligofluoroside)。在链组装结束时,用二氯乙酸的二氯甲烷溶液或二氯乙酸的甲苯溶液除去单二甲氧基三苯甲基(MMT)基团或二甲氧基三苯甲基(DMT)基团。使用浓氢氧化铵水溶液在室温下将染料从固体载体上裂解2-4小时。将产物真空浓缩,使用Sephadex G-25柱分离主要产物。使用与质谱仪耦合的RP-HPLC方法进行分析以进行分子量测定。

[0299] 实施例4

[0300] 炔亚磷酰胺的合成



[0301]



[0302] 用于制备结构(I)的化合物的某些实施方案的亚磷酰胺如下制备。

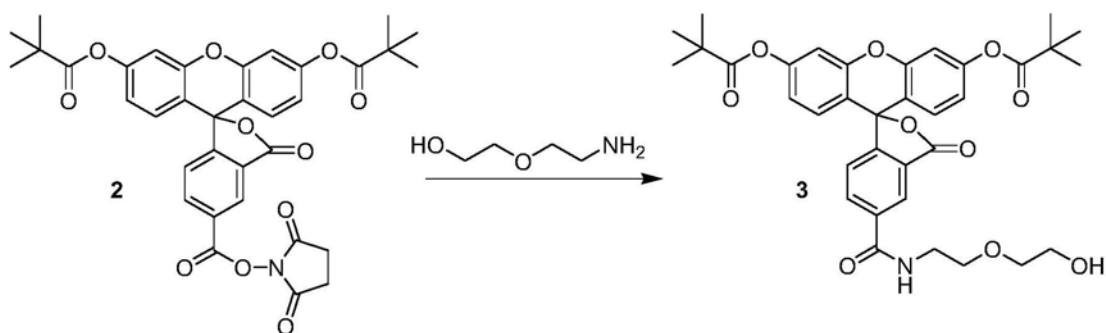
[0303] 在配有加料漏斗和磁搅拌器的500mL圆底烧瓶中,将氯甲酸炔丙酯(1.3mL)置于二氯甲烷(75mL)中。用氮气吹扫烧瓶。在另一个烧杯中,将氨基醇6(2.0g)置于二氯甲烷(60mL)、甲醇(10mL)和三乙胺(1.4mL)中。向加料漏斗中加入氨基醇溶液,并在30分钟内滴加。将烧瓶搅拌2小时,此时TLC显示反应完成。将反应混合物在旋转蒸发器上浓缩,并在高真空下进一步干燥,并直接用于下一步骤。

[0304] 在具有磁搅拌器的500mL圆底烧瓶中加入氨基甲酸酯7(~3.1g)。将吡啶加入烧瓶(270mL)中并开始搅拌。一旦氨基甲酸酯溶解,将溶液置于冰上并在氮气下搅拌15分钟。通过粉末漏斗一次性将二甲氧基三苯甲基氯(5.9g)加入烧瓶中。将烧瓶用氮气再次充气并在0℃下搅拌1小时。将烧瓶从冰中取出并在室温下搅拌过夜。加入甲醇(10mL)并将混合物搅拌10分钟。将混合物在旋转蒸发器上浓缩,并通过硅胶色谱法纯化。通过TLC测定产物分数,合并并浓缩至最终油状物,得到单保护的二醇8(3.3g)。

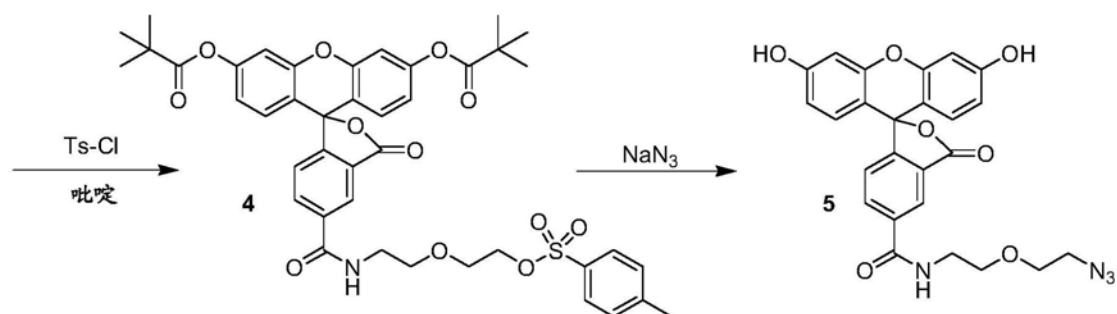
[0305] 在具有磁搅拌棒的100mL圆底烧瓶中放置单保护二醇8(500mg)和二氯甲烷(5mL)。搅拌混合物,使原料溶解。在分开的注射器中同时滴加二异丙基乙胺(600mg)和2-氰基乙基-N,N-二异丙基氯亚磷酰胺(440mg)。将混合物搅拌1小时,此时TLC显示反应完成。将该物质倒入碳酸氢钠溶液中,用二氯甲烷萃取。用硫酸钠干燥有机层,过滤并浓缩成油。通过硅胶色谱法,用5%三乙胺的二氯甲烷完成另外的纯化。通过TLC鉴定产物级分,合并并浓缩。分离出最终产物,为透明油状物(670mg)。

[0306] 实施例5

[0307] 包含叠氮化物的染料部分的制备



[0308]



[0309] 如下制备用于制备结构(I)的化合物的某些实施方案的包含叠氮化物的荧光素部分。

[0310] 在具有磁搅拌棒和加料漏斗的250ml圆底烧瓶中加入FAM-NHS酯2 (2.24g)。向烧瓶中加入二氯甲烷 (35mL)，开始搅拌，将烧瓶置于氮气下并在冰上冷却。在另一个烧杯中，将2-(2-氨基乙氧基)乙醇 (420μL) 溶于二氯甲烷 (35mL)、甲醇 (7mL) 和三乙胺 (1.5mL) 中，并将所得溶液加入加料漏斗中。在30分钟内将胺溶液滴加到NHS酯中。将最终溶液在0℃下搅拌1小时，将烧瓶从冰浴中取出并在室温下搅拌2小时。浓缩反应混合物，通过硅胶色谱法纯化粗产物。通过TLC和LC/MS检查产物级分并合并，得到1.6g (72%)。

[0311] 在带有磁搅拌棒的250mL圆底烧瓶中放入FAM醇3 (1.5g) 和氯仿 (25mL)。向该溶液中加入吡啶 (470μL) 和对甲苯磺酰氯 (691mg)。将混合物搅拌24小时，此时TLC显示反应不完全，加入另外的对甲苯磺酰氯 (1.4g) 和吡啶 (1.5mL) 并将混合物再搅拌24小时。48小时后TLC显示反应完成。将混合物倒入萃取漏斗中的饱和碳酸氢钠 (200mL) 和二氯甲烷 (100mL) 中并分配。保留有机层，水层用二氯甲烷 (100mL) 再萃取两次。合并有机层并用硫酸钠干燥，过滤并浓缩。通过硅胶色谱法纯化粗产物。通过TLC鉴定产物级分并合并，得到所需的甲苯磺酸酯4 (1.8g)。

[0312] 在具有磁搅拌器的200mL圆底烧瓶中放入FAM-甲苯磺酸酯4 (1.8g) 和DMF (15mL)，搅拌混合物以实现溶解。向其中加入叠氮化钠 (830mg) 并将混合物加热至50℃并搅拌过夜。将混合物倒入萃取漏斗中的100mM柠檬酸 (150mL) 和乙酸乙酯 (150mL) 中。分层并保留有机层。将水层用乙酸乙酯再萃取两次。合并有机层，用硫酸钠干燥。过滤溶液并通过旋转蒸发浓缩。通过硅胶色谱法纯化粗油，通过TLC和合并鉴定产物级分。将产物真空浓缩，得到所需的FAM-aizde 5，为橙色固体 (0.82g)。LCMS与所需产物一致。

[0313] 实施例6

[0314] 寡聚体化合物及其制备

[0315] 3-、5-和10-mer聚炔寡聚体由实施例4的亚磷酰胺制备。有代表性的3-mer染料如



下制备：

[0316] 在500 $\mu$ L微量离心管中加入磷酸盐缓冲液(31.5 $\mu$ L, 150mM, pH=7.4)。向其中加入香豆素叠氮化物(22.5 $\mu$ L, 10mM在DMSO中)和聚炔(7.5 $\mu$ L, 1mM水溶液)的溶液。在另一个200 $\mu$ L微量离心管中放入硫酸铜(3.0 $\mu$ L, 50mM), 三(3-羟丙基三唑基甲基)胺(THPTA, 3.0 $\mu$ L, 100mM)和抗坏血酸钠溶液(7.5 $\mu$ L, 100mM)的溶液。将铜溶液混合, 并将全部内容物加入到香豆素叠氮化物/聚炔管中。将反应混合并在室温下孵育过夜。将混合物用水(75 $\mu$ L)稀释, 并通过尺寸排阻色谱法纯化(Superdex 200增加5/150GL, 用PBS等度洗脱, 0.25mL/min, 在405nm和260nm下检测)。

[0317] 以类似方式制备具有香豆素或荧光素部分的3-, 5-和10-mer染料。由此制备的低聚物染料与根据实施例3制备的化合物缀合。或者, 实施例1和4的亚磷酰胺颗粒与适当的间隔基亚磷酰胺(可从Glenn Research商购)在如上所述的标准DNA偶联方法下组合使用, 得到可以转化为如上所述结构(I)的化合物的寡聚体。

[0318] 本说明书中所参考的全部美国专利、美国专利申请公开、美国专利申请、外国专利、外国专利申请和非专利公开均以引用的方式整体并入本文, 其程度与本说明书不矛盾。

[0319] 从前述内容可以理解, 尽管为了说明的目的在本文中描述了本发明的特定实施方案, 但是在不偏离本发明精神和范围的情况下可以进行各种修改。因此, 除了所附权利要求之外, 本发明不受限制。